Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. - W. A l t m a n n

DIE WIRKUNG VON CYTOSTATIKA UND IMMUNSUPPRESSIVA (CYCLOPHOSPHAMID, METHOTREXAT, AZATHIOPRIN) AUF DIE REGENERIERENDE RATTENLEBER NACH 2/3-TEILHEPATEKTOMIE

- Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin - *

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Werner Lazarus
aus Würzburg

Würzburg, 14. Mai 1981

* mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. - W. A l t m a n n

DIE WIRKUNG VON CYTOSTATIKA UND IMMUNSUPPRESSIVA (CYCLOPHOSPHAMID, METHOTREXAT, AZATHIOPRIN) AUF DIE REGENERIERENDE RATTENLEBER NACH 2/3-TEILHEPATEKTOMIE

- Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin - *

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Werner Lazarus
aus Würzburg

Würzburg, 14. Mai 1981

* mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Referent:	Prof. Dr. med. W.-D. Heine
Korreferent:	Prof. Dr. med. H.-W. Altmann
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der Promotion: 03. November 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Grundlagen 2

2.1. Der Zellzyklus und die Bestimmung der Dauer seiner Teilphasen 2

2.2. Die Regeneration des Leberparenchyms nach 2/3-Teilhepatektomie 8

III. Material und Methodik 12

3.1. Tiermaterial 12

3.2. Teilhepatektomie 12

3.3. Autoradiographie mit ^{3}H-Thymidin und Applikation der Cytostatika 12

3.3.1. Versuchsanordnung A: ^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion 13

3.3.2. Versuchsanordnung B: ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion 16

3.4. Impulsmessung über veraschten Paraffinschnitten 18

IV. Ergebnisse 19

4.1. Versuchsanordnung A 19

4.1.1. Zellzahl pro Blickfeld 19

4.1.2. Markierungs- und Mitoseindex 21

4.1.3. Silberkorndichte über markierten Hepatozytenkernen im Vergleich mit Markierungsindex und gemessener Radioaktivität 32

4.2. Versuchanordnung B 35

4.2.1. Zellzahl pro Blickfeld 35

4.2.2. Markierungsindex der Hepatocyten im Vergleich zur gemessenen Radioaktivität 37

4.2.3. Markierungsindex der Sinuswandzellen und Gallengangsepithelien 40

V. Diskussion 42

5.1. Der zeitliche Ablauf der Leberparenchym-Regeneration nach Teilhepatektomie 42

5.2. Mögliche Angriffspunkte im Zellzyklus der Hepatozyten 44

5.2.1. Cyclophosphamid 44

5.2.2. Methotrexat 48

5.2.3. Azathioprin 52

5.3. Betrachtungen zur Zellkinetik der Sinuswandzellen bzw. Kupffer-Zellen 60

5.3.1. Besonderheiten des Zellzyklus 60

5.3.2. Lokalisation und Ursachen der Kupfferzellproliferation 62

VI. Zusammenfassung 65

VII. Literaturverzeichnis 68

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0016

I. EINLEITUNG

Cytostatika und Immunosuppressiva finden zur Behandlung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen in der Klinik zunehmend Verwendung. Ob diese Stoffe auf normal regenerierendes Gewebe obligatorisch einen hemmenden Effekt haben, ist nicht endgültig geklärt. Ebenso ist der genaue Angriffspunkt in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus nicht hinreichend bekannt (KLINGE, HEINE und RÖSCHLAU 1973). Dosierung und Applikationsmuster müssen im Einzelfall empirisch gefunden werden, da die Toleranz des Wirtsorganismus gegenüber cytotoxisch wirkenden Medikamenten bis heute der begrenzende Faktor der Cytostatikatherapie ist (HOFFMAN und POST 1973).

Die Leberregeneration nach 2/3-Teilhepatektomie im Tierversuch wird von zahlreichen Autoren verwendet als in vivo-System zur reproduzierbaren Analyse von Zellteilungs- und Proliferationsvorgängen in einem nicht neoplastischen Zellverband, wobei der Einfluß verschiedener Medikamente auf das regenerierende Lebergewebe von besonderem Interesse ist. Untersuchungen an der Leber werden durch die Tatsache begünstigt, daß die relativ einfache Anordnung der Leberzellen im Leberläppchen auch nach wiederholten Teilhepatektomien die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Zellzahl erlaubt (ALTMANN 1966; HEINE 1973).

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe autoradiographischer Technik unter Verwendung von ^{3}H-Thymidin die Einwirkung der alkylierenden Substanz Cyclophosphamid, des Folsäureantagonisten Methotrexat und des Purinantagonisten Azathioprin auf regenerierendes Lebergewebe der Ratte nach 2/3-Teilhepatektomie untersucht und dabei auch geprüft werden, ob unterschiedliche Applikationsmuster (Pulsinjektion bzw. Dauerinfusion der Medikamente) das Ausmaß einer eventuellen Regenerationshemmung beeinflussen.

II. GRUNDLAGEN

2.1. Der Zellzyklus und die Bestimmung der Dauer seiner Teilphasen

Die Kenntnis über den Ablauf des Zellzyklus und die Länge seiner Teilphasen ermöglicht erst Untersuchungen, mit denen die Angriffspunkte cytostatisch wirksamer Medikamente im Zellzyklus genauer bestimmt werden können.

In Untersuchungen am Dünndarmepithel der Maus entwickelten QUASTLER und SHERMAN (1959) Methoden, die von vielen Autoren in späteren Arbeiten verwendet wurden (z.B. STÖCKER und BACH 1965; STÖCKER und HEINE 1965; FABRIKANT 1968; RABES et al. 1972). In schnell proliferierenden bzw. regenerierenden Geweben lassen sich vier Zyklusphasen unterscheiden und ihre Dauer aus graphischen Darstellungen der Zellkinetik näherungsweise bestimmen. Durch direkte Beobachtung können mitotische von intermitotischen Zellen unterschieden werden, letztere durch autoradiographische Technik (s. Abschn. III) in Zellen mit und ohne DNS-Synthese unterteilt werden. Damit ergeben sich für den Generationszyklus an regenerierenden Geweben vier Phasen, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind: die Mitose (M), die präsynthetische Interphase oder postmitotic gap (G_1), die Phase der DNS-Synthese (S) und die postsynthetische Interphase, auch premitotic gap (G_2) genannt. Es gibt keine endgültige Klarheit über die biochemischen Prozesse in G_1 bzw. G_2 (GRISHAM 1973), mit großer Wahrscheinlichkeit beinhaltet die G_1-Phase die Bildung von Reduplikationsenzymen (Polymerasen etc.) zur Vorbereitung der DNS-Synthese, in der G_2-Phase wird möglicherweise die Aufgliederung des vermehrten Chromosomenmaterials auf zwei in der folgenden Karyokinese voneinander getrennten Tochterchromosomen

vorbereitet und durchgeführt, z.B. in Form einer Synthese von Spindelproteinen (ALTMANN 1966).

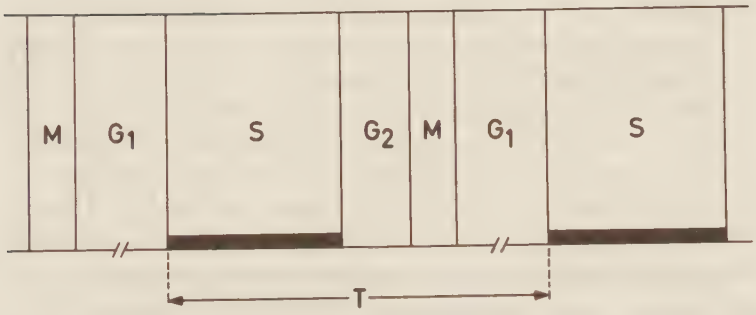


Abb. 1

Schema der Phasen des Zellzyklus in regenerierendem Gewebe (in Anlehnung an QUASTLER und SHERMAN, vereinf., s. Text)

M = Mitose

G_1 = Präsynthetische Interphase oder postmitotic gap

S = DNS-Synthesephase

G_2 = Postsynthetische Interphase oder premitotic gap

T = Gesamt-Zyklusdauer

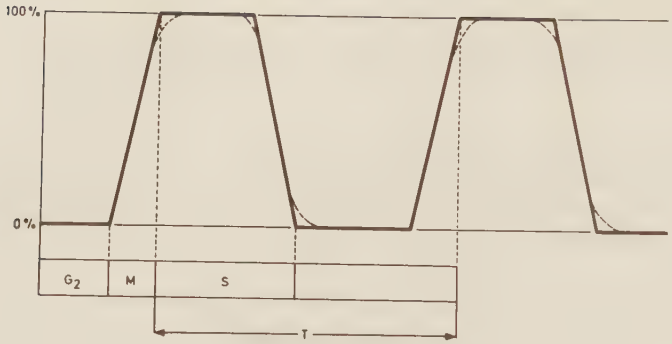


Abb. 2

Prozentsatz markierter Mitosen in Abhängigkeit von der radioaktiven Versuchszeit (= Zeit zwischen Injektion von ^{3}H-Thymidin und Tötung der Versuchstiere). Nach QUASTLER und SHERMAN, vereinf.; Erklärung s. Text.

Abbildung 2 zeigt die "Prozent markierte Mitosen-Methode" zur Bestimmung der Teilphasenlängen des Zellzyklus nach QUASTLER und SHERMAN (1959) in einer schematischen Darstellung, die allerdings auf der hypothetischen Tatsache beruht, daß alle Phasen des Zellzyklus immer wieder von jeweils konstanter Dauer sind. Zum Kurvenverlauf können folgende Überlegungen gelten (SCHULTZE 1968): Nach einmaliger Injektion von ^{3}H-Thymidin werden alle Zellen markiert, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase befinden. Dann passieren immer mehr Zellen die G_2-Phase und anschließend

die Mitose. Ist die Zeit zwischen der Injektion von ^3H-Thymidin und der Tötung des Versuchtieres (= radioaktive Versuchszeit) kleiner als G_2, so werden noch keine markierten Mitosen beobachtet. Die ersten markierten Mitosen treten auf, wenn die radioaktive Versuchszeit größer als G_2 wird. Wenn die radioaktive Versuchszeit größer als G_2 + M ist, sind alle (= 100%) Mitosen markiert. Die Kurve bleibt auf diesem Plateauwert, bis die Versuchszeit größer als G_2 + M + S ist. Danach treten wieder die ersten unmarkierten Mitosen auf. Die Zeit vom ersten Auftreten markierter Mitosen bis zum ersten Wiederauftreten unmarkierter Mitosen entspricht der Dauer der S-Phase, die gewöhnlich zwischen den 50%-Werten des auf- und absteigenden Kurvenschenkels abgelesen wird. Der Abstand zwischen dem Zeitpunkt 0 und dem ersten Auftreten markierter Mitosen entspricht dem Minimalwert von G_2. Die Zeit zwischen dem Nullpunkt und dem Erreichen des 100%-Wertes ist der Maximalwert für die Dauer von G_2 + M. Subtrahiert man die so ermittelten Werte von der gesamten Generationszeit (T), kann der Wert für die G_1-Phase indirekt bestimmt werden.

Mit dieser Methode ermittelten STÖCKER und PFEIFER (1967) an der regenerierenden Rattenleber nach 2/3-Teilhepatektomie eine S-Phasendauer von 7,2 Stunden (mit geringer Schwankungsbreite), eine minimale G_2-Dauer von 2 Stunden, eine maximale von 4,5 - 5 Stunden, sowie eine Mitosedauer von 1 - 1,5 Stunden.

Die von verschiedenen Autoren ermittelten Teilphasenlängen des Zellzyklus nach 2/3-Teilhepatektomie sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Zeitdauer von Zellzyklusphasen in Leberparenchymzellen nach Teilhepatektomie (modifiziert nach GRISHAM 1973).

Durchschnitt. Alter oder Gewicht d. Versuchstiere	Phasendauer (Std.) T	G_1	S	G_2	M	Autor
330 g			7,2	2-5	1-1,5	STÖCKER und PFEIFER 1967
6-8 Wochen	15		8	3	1	FABRIKANT 1968
200 g			8	4,5		IWATA und OTA 1968
2,5 Jahre	17 minimal	4,5	8,4	2,5 minimal	1,5	HEINE und STÖCKER 1970
200 g	33	20	7,6	3	2	RABES et al. 1972

Zahlreiche derartige Messungen (Lit. bei SCHULTZE 1968) führen zu dem Ergebnis, daß S für viele Zellarten einer Tierart sowie für gleiche Zellarten verschiedener Spezies auffallend konstant ist (6-8 Stunden bei ausgewachsenen Tieren, 5-6 Stunden bei embryonalen Zellen).

Die Dauer der Mitosephase M zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen Feten, neugeborenen und ausgewachsenen Tieren.

Die Dauer von G_2 ist von Zellart zu Zellart verschieden, aber noch relativ ähnlich im Vergleich zu den sehr unterschiedlichen Generationszeiten.

Die Dauer von S + G_2 + M ist ebenfalls auffällig konstant, was bedeutet, daß die verschiedenen Zellen nach ihrem Eintritt in die DNS-Verdoppelung bis zum Ende der Mitose einem sehr ähnlichen Zeitplan folgen.

Die unterschiedlichen Generationszeiten verschiedener Zellarten müssen demnach auf einer großen Variationsbreite der G_1-Phasendauer beruhen. G_1 nimmt im Laufe der Entwicklung mit zunehmender Ausdifferenzierung die größten und auch die unterschiedlichsten Werte an (SCHULTZE 1968).

Die Existenz einer intermitotischen Funktionsphase G_0 bzw. einer potentiell teilungsfähigen G_0-Population wird erst von späteren Autoren in Betracht gezogen (z.B. FABRIKANT 1969; BUCHER und MALT 1971) und könnte die Hypothese der extrem variablen G_1-Dauer ersetzen.

2.2. Die Regeneration des Leberparenchyms nach 2/3-Teilhepatektomie

Die Leberparenchymzellen unbehandelter ausgewachsener Versuchstiere bilden in ihrer Gesamtheit ein "stabiles" Gewebe, zeigen also ohne adäquaten Proliferationsreiz wenig Tendenz zur Zellneubildung. Sie haben ihre Teilungsbereitschaft, nicht aber ihre Teilungsfähigkeit verloren (ALTMANN 1966). Diese Charakterisierung trifft ebenso wie für die Leber auch für andere Organe wie Nieren, Pankreas oder Nebenniere zu. Es handelt sich um reversibel postmitotische Zellen, welche die Fähigkeit zur kompensatorischen Regeneration besitzen, wenn sie einem adäquaten Proliferationsreiz ausgesetzt werden. Dadurch wird im Zellzyklus eine Umschaltung von der Funktionsphase G_0 auf die Proliferationsphase erzwungen (FABRIKANT 1969). Der Regenerationsimpuls wird nach ALTMANN humoral übertragen und ist als negativer Mechanismus zu charakterisieren, d.h. er beruht z.B. nach Teilhepatektomie darauf, daß eine normalerweise vorhandene Proliferationshemmung wegfällt. Dieser Hemmstoff scheint eiweißartiger Natur zu sein (evtl. Zellprodukt, "Chalon") und ist an die Existenz einer ausreichenden Zahl regelhaft funktionierender Zellen gebunden (Lit. b. ALTMANN 1966).

Dieser Erklärung wird heute der Vorzug gegeben vor der Interpretation von BÜCHNER (1961) (OEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER 1962), der eine Entdifferenzierung cytoplasmatischer Strukturen und damit eine Annäherung an die Morphologie embryonaler Zellen als morphologisches Korrelat ansah für die Wiedergewinnung der Fähigkeit zur DNS-Synthese und Zellregeneration.

Histologisch zeigen sich nach 2/3-Teilhepatektomie am

Cytoplasma Veränderungen, die z.T. unspezifisch sind (Glykogenschwund, Verfettung, intrazelluläre Eiweißtropfen, Mitochondrienschwellung, Auflösung basophiler Ergastoplasmaschollen) und als degenerativ oder reaktiv bezeichnet werden können. Proliferations-spezifisch oder "präparativ" ist dagegen die Zunahme der Kern- und Nukleolarvolumina sowie der cytoplasmatischen Basophilie, i.e. eine Vermehrung der freien Ribosomen im elektronenmikroskopischen Bild. Ihr entspricht biochemisch eine Erhöhung der RNS-Synthese und des RNS-Gehaltes als Ausdruck der genetisch determinierten Umstellung der Zelle auf den Proliferationsstoffwechsel (ALTMANN 1966; BUCHER und MALT 1971).

Nach 2/3-Teilhepatektomie zeigen autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin, daß im Regenerationszyklus der Lebenparenchymzelle eine Verkürzung von G_2, wahrscheinlich ebenso eine Verkürzung von S eintritt, wobei eine Steigerung der DNS-Syntheserate um den Faktor 2 als Verdoppelung der Silberkornzahl pro Kern zu beobachten ist (STÖCKER und BACH 1965; STÖCKER und PFEIFER 1965).

Der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex, d.h. der Prozentsatz markierter Zellkerne gemessen an der Gesamtzahl der Hepatocyten, steigt nach 2/3-Teilhepatektomie etwa um das 300-fache an, ebenso der Mitoseindex. Die Proliferation der Leberzellen setzt dabei ca. 16 Stunden p.op. mit einer DNS-Synthese ein, die nach weiteren 4 Stunden einen ersten Höhepunkt hat und weitere 8 Stunden später von einem Mitosegipfel gefolgt ist (ALTMANN 1966), wobei der Markierungsindex bis zu einem Maximum von ca. 30% ansteigen kann und stets etwa 8-15 mal größer ist als der Mitose-Index (Lit. b. SCHULTZE 1968).

Ein kleiner initialer Mitosegipfel, sowohl an Leber wie

an Niere ca. 6 Stunden nach Einwirkung des Regenerationsreizes, also lange vor dem eigentlichen Anstieg der Mitosekurve, ist unspezifisch und bedeutet keine Steigerung der Zellvermehrung, sondern entsteht durch eine postoperative Verzögerung des Mitoseablaufs, resultiert also auch nicht aus einem bei Bedarf proliferationsbereiten G_2-Blastem (STÖCKER und HEINE 1965; Lit. b. ALTMANN 1966).

Auch in den Leberparenchymzellen seniler Ratten (2,5 Jahre alt) kann durch die 2/3-Teilhepatektomie eine Umschaltung auf einen schnelleren Proliferationsmodus erzwungen werden (HEINE und STÖCKER 1970). Hierbei läßt sich nachweisen, daß sich die noch zur Proliferation fähigen Zellen nur durch eine verlängerte G_2-Phase von den proliferierenden Zellen eben ausgewachsener Tiere (3 Monate alt) unterscheiden. Die non growth-fraction, d.h. der Anteil nicht mehr zu Proliferation und Regeneration fähigen Hepatocyten, ist bei senilen Tieren allerdings größer als bei juvenilen, ebenso der Anteil gestörter Teilungsvorgänge (abnorme Verlängerung der G_2-Phase führt zu einer pathologischen Mitose) (HEINE und STÖCKER 1970). Bei juvenilen Tieren (3 - 4 Wochen alt) dagegen sind fast alle Epithelzellen an der Regeneration nach Teilhepatektomie beteiligt, die non growth-fraction also sehr klein. Trotz größerer non growth-fraction wird auch bei senilen Tieren das Ausgangsgewicht der resezierten Leber wieder erreicht, woraus folgt, daß von der geringen Zahl proliferationsfähiger Zellen im Senium die Karyokinese häufiger durchlaufen wird als bei jüngeren Tieren (STÖCKER und HEINE 1971; STÖCKER, SCHULTZE, HEINE und LIEBSCHER 1972).

Nach RABES, WIRSCHING und TUCZEK (1972) werden die DNS-Synthesewellen nach Teilhepatektomie von der gleichen Zellpopulation getragen, d.h. die Hepatocyten können

nach diesem Regenerationsreiz wiederholt in den Zellzyklus eintreten und die Mitose passieren. Erst unter dieser Voraussetzung ist es gerechtfertigt, den Abstand zweier aufeinanderfolgender Maxima in der "Prozent markierte Mitosen-Kurve" tatsächlich als Zellzyklusdauer zu betrachten, die nach RABES et al. ca. 33 Stunden beträgt.

Die DNS-Synthese in der 2/3-teilhepatektomierten Mäuseleber folgt einem circadianen Rhythmus, erkennbar am Auftreten mehrerer, in der Höhe allerdings abnehmender Gipfel des ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex bei Messung zwischen 25 und 85 Stunden nach Teilhepatektomie (BADE, SADNIK, PILGRIM und MAURER 1966). Die verbliebene Zellpopulation wird also partiell synchronisiert, nachdem der starke Regenerationsreiz einer 2/3-Teilhepatektomie den physiologischen circadianen Rhythmus zunächst durchbricht, was daran erkennbar ist, daß zwischen der Teilhepatektomie und dem Auftreten der ersten Zellteilungen immer ein konstanter Zeitraum liegt, in welchem sich präparativproliferative Umstellungen des Leberepithels, wie DNS-Synthesen und Spindelproduktionen, vollziehen (ALTMANN 1966).

Bei Beobachtung des Zellersatzes über einen längeren Zeitabschnitt (Mitoseindex in Abhängigkeit von der Zeit post operationem) ergibt sich eine allmähliche Rückkehr zur ursprünglichen physiologischen circadianen Rhythmik (KLINGE und MATHYL 1969).

III. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Tiermaterial

Die autoradiographischen Untersuchungen wurden an insgesamt 132 männlichen, eben ausgewachsenen (2 - 3 Monate alten) Albinoratten vom Sprague-Dawley-Stamm durchgeführt. Das mittlere Tiergewicht betrug in Versuchsanordnung A (^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion, s.u.) 285 ± 20 g, in Versuchsanordnung B (^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion, s.u.) 222 ± 41 g (Futter und Wasser ad lib.). Pro Gruppe wurden 3 - 5 Tiere verwendet.

3.2. Teilhepatektomie

An den Versuchstieren wurde eine 2/3-Teilhepatektomie nach der Methode von HIGGINS und ANDERSON (1931) vorgenommen, ebenso an den Kontrolltieren. Dabei wird an der Rattenleber der große Mittellappen zusammen mit dem linken lateralen Lappen entfernt, wodurch die ursprüngliche Lebermasse um 65 - 75% reduziert ist.

3.3. Autoradiographie mit ^{3}H-Thymidin und Applikation der Cytostatika

Da Thymidin ein spezifischer DNS-Vorläufer ist, kann diese Substanz, mit Tritium markiert (= ^{3}H-Thymidin), in Untersuchungen der DNS-Synthese, der Zellprolifera-

tion und -kinetik verwendet werden. In die DNS der Zellkerne eingebautes ^{3}H-Thymidin stellt sich im histologischen Präparat, das mit einer Photo-Emulsion (Ilford-Emulsion) beschichtet wurde, als schwarze Silberkornmarkierung über dem Zellkern dar. Die ß-Strahlung des Tritiums hat eine nur geringe Reichweite, so daß die Silbermarkierung im Autoradiogramm kaum die Grenzen der Zellkerne überschreitet (SCHULTZE 1968).

Im Organismus wird nur ein kleiner Teil des verabreichten ^{3}H-Thymidins in die DNS inkorporiert, während der größte Teil abgebaut wird, bevorzugt in der Leber, auch nach 2/3-Teilhepatektomie. Der Einbau in die DNS erfolgt ebenfalls sehr rasch, die sogenannte Verfügbarkeitszeit beträgt nur 40 - 60 Minuten, wobei der Hauptteil in den ersten 20 Minuten eingebaut wird (Lit. b. SCHULTZE 1968).

In den vorliegenden Versuchen wurde ^{3}H-Thymidin (2 mCi/d, spezifische Aktivität 20,0 Ci/mMol, Nen, Boston) in zwei Versuchsanordnungen appliziert, nämlich als Pulsinjektion (Versuchsanordnung A) sowie als Dauerinfusion (Versuchsanordnung B).

3.3.1. Versuchsanordnung A: ^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion

Bei Pulsinjektion von ^{3}H-Thymidin intraperitoneal ca. 1 - 3 Stunden vor der Tötung werden alle zum Zeitpunkt der Injektion in DNS-Synthese befindlichen Zellkerne markiert. Erfolgt die Tötung der Tiere, wie in den vorliegenden Versuchen (A), nach einem Zeitintervall, das kürzer als G_2 + M ist, kann durch Auswertung des ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der momentane Proliferationsumfang der untersuchten Zellpopulation ermittelt werden.

Die Auswertung zu verschiedenen Zeiten nach einem Regenerationsimpuls, z.B. im Abstand von 2 - 4 Stunden, läßt den zeitlichen Ablauf eines Regenerationsvorgangs sehr genau erkennen (HEINE 1973).

Um den zeitlichen Ablauf der Regeneration nach Teilhepatektomie für Hepatozyten und Sinuswandzellen verfolgen zu können, wurden die Tiere (3 - 5 pro Gruppe) zwischen der 20. und der 40. Stunde nach 2/3-Teilhepatektomie in 4-stündigen Abständen getötet, nachdem jedes Tier 1 Stunde vor der Tötung eine einmalige ^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion intraperitoneal erhalten hatte.

Die Kontrolltiere erhielten außer dieser Injektion keine weiteren Stoffe.

Die Versuchstiere erhielten unmittelbar im Anschluß an die Teilhepatektomie eine tägliche intraperitoneale Einzelinjektion eines Cytostatikums:

die alkylierende Substanz Cyclophosphamid (60 mg/kg/d), den Folsäureantagonisten Methotrexat (1,3 mg/kg/d) oder den Purinantagonisten Azathioprin (25 mg/kg/d).

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation im Ätherrausch, die Restleber wurde entnommen, die davon angefertigten Schnitte mit Ilford-Emulsion beschichtet und 20 Tage lang exponiert.

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuchsanordnung A zeigt Tabelle 2.

Tab. 2:

Versuchsanordnung A (^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion, Cytostatika - Pulsinjektion)

2/3-Teilhepatektomie + 1 tägliche i.p. Injektion von

1. Cyclophosphamid (60 mg/kg/d) oder
2. Methotrexat (1,3 mg/kg/d) oder
3. Azathioprin (25 mg/kg/d)

Tötung der Tiere zwischen der 20. und 40. Stunde nach Teilhepatektomie in 4-stündigen Abständen.

^{3}H-Thymidin-Injektion i.p. jeweils 1 Stunde vor Tötung.

Ausgewertet wurden mikroskopisch mit einem Netzmikrometer bei 1000-facher Vergrößerung (100 Blickfelder pro Präparat):

1. die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld.

2. der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex (= ^{3}H-Index) der Hepatozyten, d.h. der Prozentsatz der mit ^{3}H-Thymidin markierten Zellkerne, bezogen auf alle in einem Präparat ausgezählten Hepatozyten.

3. ebenso der ^{3}H-Index der Sinuswandzellen.

4. der Mitoseindex der Hepatozyten, d.h. der Prozentsatz der Zellteilungsfiguren, bezogen auf alle in einem Präparat ausgezählten Hepatozyten.

5. die Silberkorndichte (n/μ^2) über markierten Hepatozyten-Kernen 20 Stunden nach Teilhepatektomie.

3.3.2. Versuchsanordnung B: ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion

Durch kontinuierliche intravenöse Infusion von ^{3}H-Thymidin werden alle über einen längeren (Infusions-) Zeitraum in die S-Phase eintretenden und sich teilenden Kerne autoradiographisch geschwärzt. Dadurch läßt sich die tatsächliche Zahl neugebildeter und im Gewebe verbliebener Zellen bestimmen (STÖCKER und HEINE 1971; HEINE 1973).

In der vorliegenden zweiten Versuchsanordnung erhielten die Ratten unmittelbar anschließend an die Teilhepatektomie eine Dauerinfusion von ^{3}H-Thymidin mit einem dünnen Katheter in eine der vier Schwanzvenen. Die pro Tier in 24 Stunden infundierte ^{3}H-Thymidin-Aktivität betrug 2 mCi.

Die Kontrolltiere erhielten außer dieser Infusion keine weiteren Stoffe.

Die Versuchstiere erhielten im Anschluß an die 2/3-Teilhepatektomie je eines der verwendeten Cytostatika, nämlich Cyclophosphamid (60 mg/kg/d), Methotrexat (1,3 mg/kg/d) oder Azathioprin (25 mg/kg/d).

Die Cytostatika wurden dabei in zwei verschiedenen Formen appliziert:

- als Dauerinfusion gleichzeitig mit dem radioaktiven ^{3}H-Thymidin in eine Schwanzvene oder

- als tägliche einmalige Pulsinjektion ebenfalls in den Schwanzvenenkatheter.

Die Tagesdosis der Medikamente war in allen Versuchsanordnungen gleich (s. Tabelle 2).

Die Tiere wurden 72 Stunden nach Anlegen der ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion getötet.

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuchsanordnung B zeigt Tabelle 3.

Tab. 3:

Versuchsanordnung B (^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion, Cytostatika-Dauerinfusion oder -Pulsinjektion)

2/3-Teilhepatektomie + ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion mit

1. Dauerinfusion von	-Cyclophosphamid	(60 mg/kg/d) oder
	-Methotrexat	(1,3 mg/kg/d) oder
	-Azathioprin	(25 mg/kg/d)
2. tägliche Pulsinjektion von	-Cyclophosphamid	(60 mg/kg/d) oder
	-Methotrexat	(1,3 mg/kg/d) oder
	-Azathioprin	(25 mg/kg/d)

Tötung der Tiere 72 Stunden nach Anlegen der ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion.

Ausgewertet wurden aus Versuchsanordnung B:

1. die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld,

2. der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Hepatozyten, Sinuswandzellen und Gallengangsepithelien.

3.4. Impulsmessung über veraschten Paraffinschnitten

Um den durch Silberkornzählung und Auszählung des Markierungsindex erhaltenen Hinweisen auf eine veränderte DNS-Syntheserate nachzugehen, wurden die Paraffinschnitte der 20 Stunden nach Teilhepatektomie getöteten Kontroll- und Versuchstiere aus Versuchsanordnung A verascht und im Szintillationszähler die von einem Präparat ausgesandten radioaktiven Impulse pro Zeiteinheit gemessen. Die Meßergebnisse wurden in Mikrocurie pro Gramm Lebertrockengewicht umgerechnet, woraus quantitativ auf die jeweilige DNS-Syntheserate in einem Präparat zum Zeitpunkt der Messung geschlossen werden kann.

Nach dem gleichen Verfahren wurden die Präparate der Versuchsanordnung B (^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion) untersucht (s. Abschnitt 4.2.3.).

IV. ERGEBNISSE

4.1. Versuchsanordnung A

4.1.1. Zellzahl pro Blickfeld

Die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyten pro Blickfeld ($n/10^2\ \mu^2$) unter 1000-facher Vergrößerung zeigt bei den Kontrolltieren einen kontinuierlichen Abfall von der 20. zur 32. Stunde nach Teilhepatektomie (Abb. 3). Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Kurve der Methotrexat-behandelten Tiere, die ihr Minimum ($11{,}9/10^2\ \mu^2$) jedoch schon zur 28. Stunde erreicht. Auffallend ist der steile Abfall bei den Azathioprin-behandelten Versuchstieren mit einem Minimum ($9{,}3/10^2\ \mu^2$) bei 28 Stunden post op., was als Zellhypertrophie gedeutet werden kann.

Die Anzahl der Sinuswandzellen pro Blickfeld (wegen der geringeren Zahl hier dargestellt als Zellzahl pro 100 Blickfelder, also $n/10^4\ \mu^2$, s. Abb. 4) unterliegt zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten starken Schwankungen sowohl bei den Kontrolltieren als auch nach Cytostatika-Pulsinjektion. Unter Cyclophosphamid zeigt sich nach 32 Stunden, also 2 Pulsinjektionen, ein dem Ausgangswert 20 Stunden postoperativ vergleichbares Maximum ($142{,}8/10^4\ \mu^2$), unter Azathioprin wird ein sehr niedriger Wert ($28{,}0/10^4\ \mu^2$) nach 36 Stunden erreicht. Das Verhalten der Sinuswandzellen deutet auf eine von den Hepatozyten unabhängige Zellkinetik hin, worauf im Abschnitt 5.3. noch näher eingegangen wird.

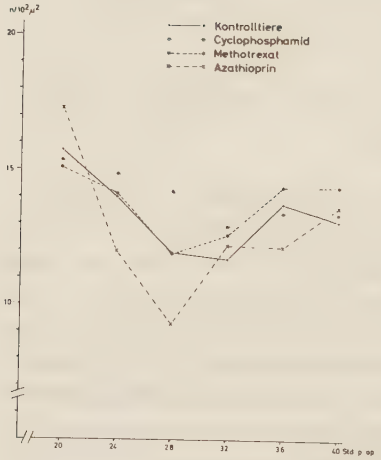


Abb. 3:

Hepatozyten pro Blickfeld

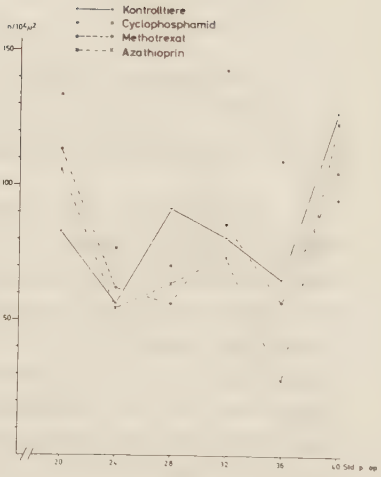


Abb. 4:

Sinuswandzellen pro 100 Blickfelder

Abb. 3 und 4:

Versuchsanordnung A

Zellzahl pro Flächeneinheit nach 2/3-Teilhepatektomie

Cytostatika-Applikation als tägliche Pulsinjektion i.p.

^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

4.1.2. Markierungs- und Mitoseindex

Der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Hepatozyten durchläuft bei den Kontrolltieren (Abb. 5) ein Maximum bei 24 Stunden (12,76%), ein Minimum bei 32 Stunden (6,31%). Der Mitoseindex steigt von 20 bis 24 Stunden langsam an (von 0,02% auf 0,18%), um nach einem Anstieg bis zur 32. Stunde postoperativ ein Maximum zu durchlaufen (4,05%), das somit etwa 8 Stunden nach dem Maximum des Markierungsindex erreicht wird (Abb. 6).

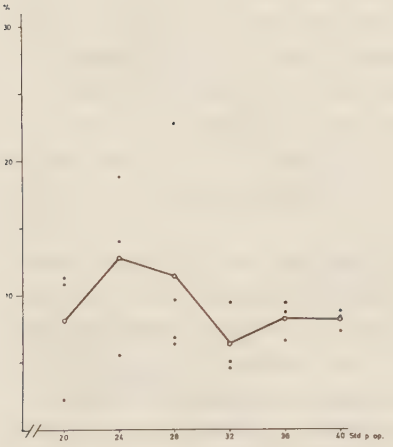


Abb. 5:

Markierungsindex

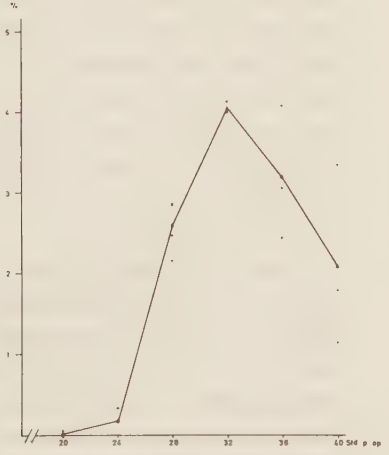


Abb. 6:

Mitoseindex

Abb. 5 und 6:

Versuchsanordnung A
^{3}H-Thymidin-Markierungsindex bzw. Mitoseindex der Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Kontrolltiere
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Nach Cyclophosphamid-Pulsinjektion (Abb. 7) liegt der Markierungsindex der Hepatozyten 20 Stunden nach Teilhepatektomie bei 22,18%, also fast dreimal so hoch wie bei den Kontrolltieren zum gleichen Zeitpunkt. Dies könnte auf eine Stimulation der DNS-Synthese oder aber auf eine Verzögerung der S-Phase nach Cyclophosphamid hinweisen. Nach einem geringen Wiederanstieg von der 28. Stunde (12,30%) zur 32. Stunde (12,95%) erreicht diese Kurve ein Minimum bei 36 Stunden (9,07%), um zur 40. Stunde hin wieder auf 13,58% anzusteigen.

Mitosen der Hepatozyten traten 20 Stunden nach Teilhepatektomie und Cyclophosphamid-Pulsinjektion (Abb. 8) noch nicht auf. Der Mitoseindex liegt 24 Stunden postoperativ bei 0,22% und damit im Bereich der Kontrollen (0,18%). Danach steigt die Kurve bis zu einem Maximum (3,78%) bei 36 Stunden an. Dieses Maximum liegt ebenfalls in der Größenordnung der Kontrollen (4,05%), wird jedoch im Vergleich zu diesen mit einer zeitlichen Verzögerung von 4 Stunden erreicht, was für eine Verzögerung der DNS-Syntheseprozesse spricht. Ein ebenfalls denkbarer Angriffspunkt in G_2 ist weniger wahrscheinlich, da der 24-Stunden-Wert des Mitoseindex unter Cyclophosphamid-Pulsinjektion nicht vermindert ist gegenüber Kontrollen. Das Maximum des Mitoseindex unter Cyclophosphamid-Ein-

wirkung folgt also erst 16 Stunden nach dem Maximum des Markierungsindex (vgl. Abb. 7). Der Mittelwert des Mitoseindex bei 28 Stunden (2,31%) ergibt sich aus vier Einzelwerten mit auffallender Streubreite (0% bis 4,64%).

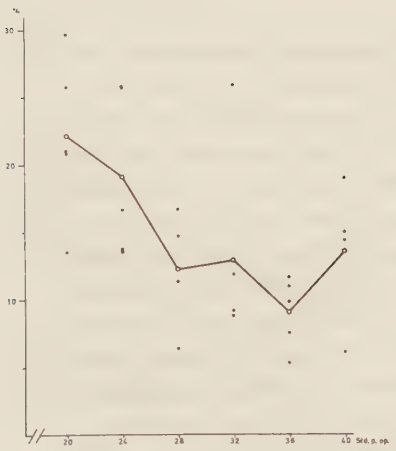


Abb. 7:

Markierungsindex

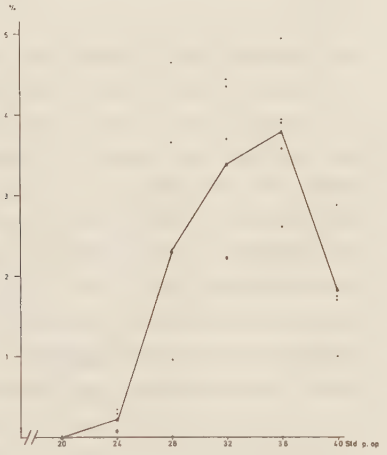


Abb. 8:

Mitoseindex

Abb. 7 und 8:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex bzw. Mitoseindex der Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Cyclophosphamid-Pulsinjektion i.p. (60 mg/kg/d)
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Nach Methotrexat-Pulsinjektion zeigt der zeitliche Verlauf des Hepatozyten-Markierungsindex (Abb. 9) große Ähnlichkeit mit der entsprechenden Darstellung nach Cyclophosphamid: bereits nach 20 Stunden ist der höchste Wert zählbar (21,06%), der anschließende Abfall der Kurve zum Minimum nach 36 Stunden hin (7,43%) wird ebenfalls durch einen geringfügigen Wiederanstieg zwischen der 28. (10,08%) und der 32. Stunde (10,72%) unterbrochen.

Der Mitoseindex beträgt unter täglicher Methotrexat-Pulsinjektion (Abb. 10) 20 Stunden postoperativ 0,04%. Nach 24 Stunden ist er auf etwa das 10-fache erhöht (0,42%) und liegt damit deutlich höher als zum gleichen Zeitpunkt bei den Kontrollen (0,18%) und nach Cyclophosphamid (0,22%). Damit ist ein Angriff von Methotrexat in der einer Mitose vorausgehenden G_2-Phase zunächst als unwahrscheinlich zu betrachten. Eher käme eine direkte Mitosehemmung bzw. -verlängerung in Frage, die zu einer scheinbaren Vermehrung der beobachteten Teilungsfiguren führt. Das Maximum des Mitoseindex 32 Stunden postoperativ (3,85%) liegt ebenfalls in der Größenordnung der Kontrolltiere. Nach diesem Maximum erfolgt ein insgesamt langsamer Kurvenabfall zur 36. Stunde (2,89%) bzw. 40. Stunde (2,87%).

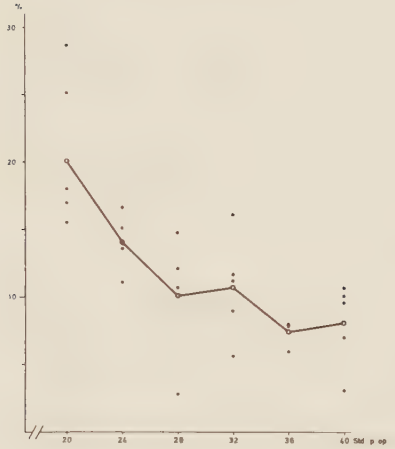


Abb. 9:

Markierungsindex

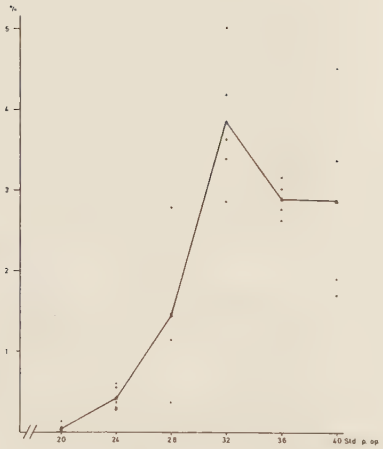


Abb. 10:

Mitoseindex

Abb. 9 und 10:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex bzw. Mitoseindex der Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie

Methotrexat-Pulsinjektion i.p. (1,3 mg/kg/d)

^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Nach Pulsinjektion von Azathioprin (Abb. 11) liegt der Hepatozyten-Markierungsindex 20 Stunden postoperativ bei 7,48% und damit im Bereich der Kontrollen. Somit scheint die Azathioprin-Pulsinjektion den Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase nicht zu verzögern. Bereits nach 24 Stunden zeigt sich ein erstes Maximum (15,11%), dem ein flacher Abfall zur 32. Stunde hin folgt (12,15%). Zur 36. Stunde hin ist der Wert wieder geringfügig angestiegen (12,41%), nach 40 Stunden sind 16,24% erreicht. Auch die hier beginnende zweite Proliferationswelle verläuft also offenbar ungestört.

20 Stunden nach Teilhepatektomie und Applikation einer Azathioprin-Pulsinjektion sind noch keine Mitosen sichtbar (Abb. 12). Nach 24 Stunden beträgt der Mitoseindex nur 0,07%, zeigt also einen deutlich geringeren Anstieg als bei den Kontrolltieren bzw. den Cyclophosphamid- und Methotrexat-behandelten Versuchstieren. Dies deutet auf einen Angriffspunkt in der einer Mitose vorausgehenden G_2-Phase hin. Das erste Maximum bei 28 Stunden beträgt 2,36% und liegt folglich weit unter den Maxima des Mitoseindex in den übrigen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Es folgt ein Abfall zur 32. Stunde (1,11%), der Wert nach 36 Stunden beträgt ebenfalls 1,11% bei größerer Streubreite, danach erfolgt wieder ein Anstieg zur 40. Stunde (1,84%).

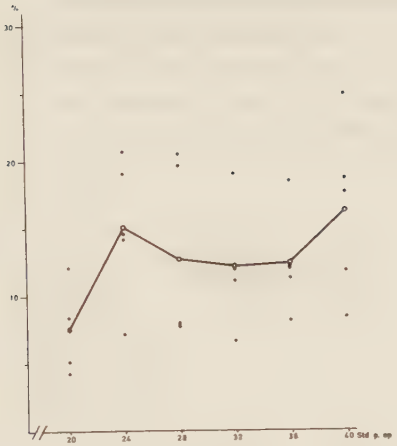


Abb. 11:

Markierungsindex

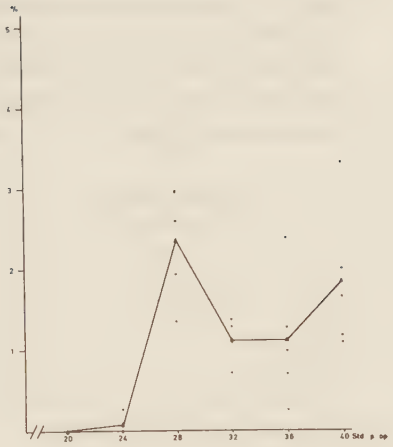


Abb. 12:

Mitoseindex

Abb. 11. und 12:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex bzw. Mitoseindex der Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.

Azathioprin-Pulsinjektion i.p. (25 mg/kg/d)

^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion 1 Stunde vor Tötung.

Abbildung 13 zeigt den Markierungsindex der Sinuswandzellen 20 bis 40 Stunden nach Teilhepatektomie (Kontrolltiere) im Vergleich zum bereits besprochenen Markierungsindex der Hepatozyten. Von einem niedrigen Wert bei 20 Stunden (0,36%) zeigt der Kurvenverlauf einen allmählichen und gegenüber den Hepatozyten verzögerten Anstieg bis zur 40. Stunde (12,1%). Dieser Wert liegt in der Größenordnung des Maximums für den Hepatozyten-Markierungsindex 24 Stunden postoperativ (12,76%).

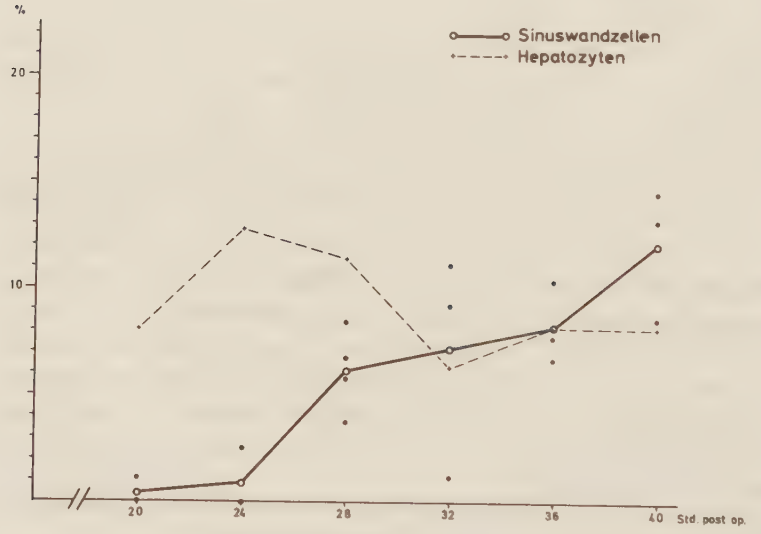


Abb. 13:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Sinuswandzellen und Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Kontrolltiere
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die entsprechende Kurve nach Cyclophosphamid-Pulsinjektion (Abb. 14), nämlich einen langsamen Anstieg von der 20. (0,56%) zur 40. Stunde hin (8,85%). Auch hier ist der bereits beschriebene Verlauf des Hepatozyten-Markierungsindex vergleichsweise aufgetragen.

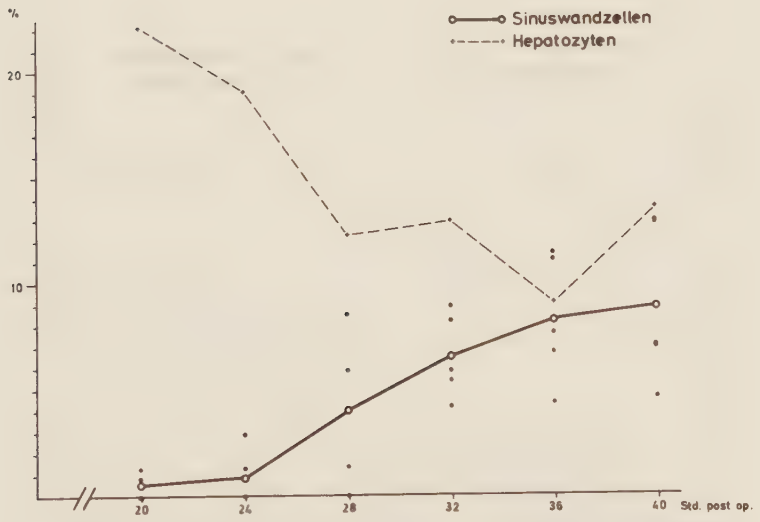


Abb. 14:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Sinuswandzellen und Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Cyclophosphamid-Pulsinjektion i.p. (60 mg/kg/d).
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Nach Methotrexat-Pulsinjektion (Abb. 15) nimmt der Markierungsindex der Sinuswandzellen einen zweigipfeligen und annähernd wellenförmigen zeitlichen Verlauf. Der 20-Stunden-Wert (1,20%) ist gefolgt von einem ersten Maximum bei 24 Stunden (5,34%), einem Minimum bei 28 Stunden (1,23%) sowie einem erneuten Anstieg zum zweiten höheren Gipfel bei 36 Stunden (11,40%). Danach fällt der Wert zur 40. Stunde hin ab (6,79%).

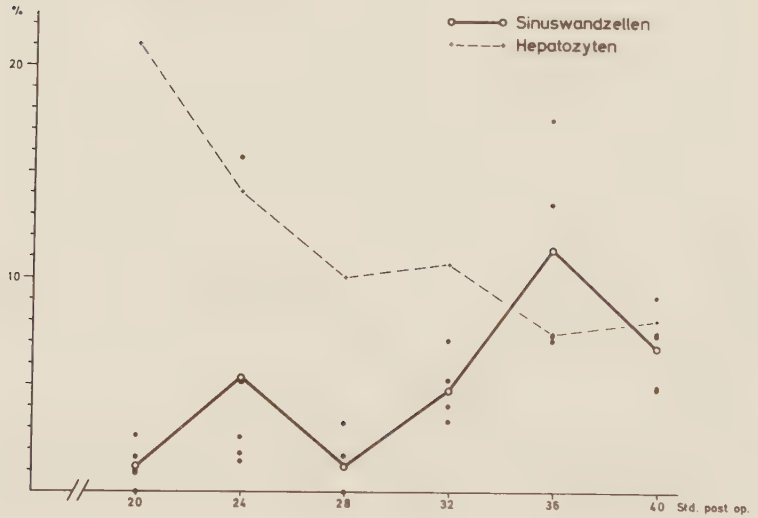


Abb. 15:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Sinuswandzellen und Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Methotrexat-Pulsinjektion i.p. (1,3 mg/kg/d).
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Nach täglicher Azathioprin-Injektion (Abb. 16) steigt der Markierungsindex der Sinuswandzellen von der 20. Stunde (0,34%) zu einem Maximalwert bei 28 Stunden postoperativ an (8,07%), um nach Durchlaufen eines Minimums bei 36 Stunden (0,80%) erneut zur 40. Stunde hin anzusteigen (5,75%).

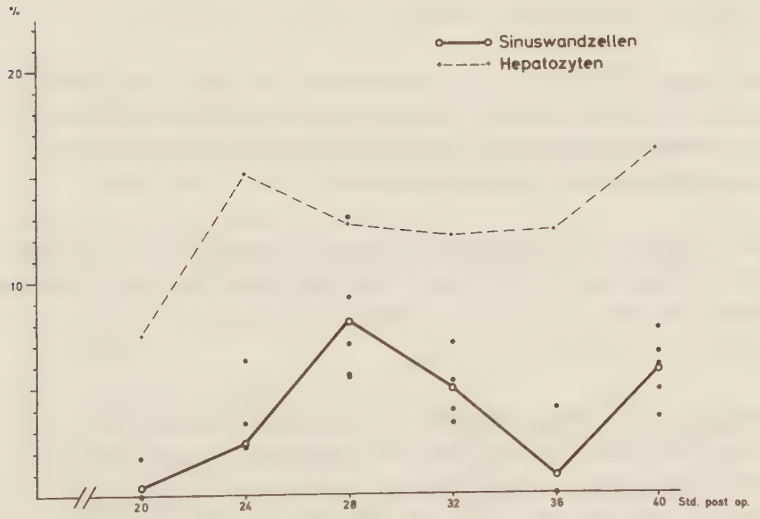


Abb. 16:

Versuchsanordnung A

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Sinuswandzellen und Hepatozyten von 20 - 40 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.
Azathioprin-Pulsinjektion i.p. (25 mg/kg/d).
^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

4.1.3. Silberkorndichte über markierten Hepatozyten-Kernen im Vergleich mit Markierungsindex und gemessener Radioaktivität

Abbildung 17 a zeigt die Silberkorndichte über den markierten Zellkernen der Hepatozyten 20 Stunden nach Teilhepatektomie bei den Kontrolltieren sowie nach Pulsinjektion der Cytostatika.

Abbildung 17 b zeigt den jeweils zugehörigen Hepatozyten-Markierungsindex zum gleichen Versuchszeitpunkt.

Abbildung 17 c zeigt die gleichzeitigen Werte der Radioaktivität (in µCi pro g Lebertrockengewicht), die aus der Messung radioaktiver Impulse über den veraschten Gefrierschnitten berechnet wurde.

Die Kontrollen weisen eine hohe durchschnittliche Silberkorndichte von 68,4/μ^2 auf, der entsprechende Markierungsindex beträgt 8,1%, die zugehörige Radioaktivität erreicht 7,25 µCi/g.

Dem zum gleichen Zeitpunkt erhöhten Markierungsindex (22,18%) nach Cyclophosphamid-Pulsinjektion entspricht eine gegenüber den Kontrollen stark erniedrigte Silberkorndichte von 38,1/μ^2, die Radioaktivität liegt mit 8,6 µCi/g etwas über dem Wert der Kontrollen. Das gegensinnige Verhalten von erhöhtem Markierungsindex einerseits und niedriger Silberkorndichte bzw. Radioaktivität andererseits spricht für eine Verzögerung der DNS-Synthese.

Die Methotrexat-Pulsinjektion hat 20 Stunden postoperativ eine relativ hohe Radioaktivität (15,99 µCi/g) zur Folge, gleichzeitig einen erhöhten Markierungsindex (21,06%)

und eine Silberkorndichte, die mit 64,2/μ^2 im Bereich der Kontrollen liegt.

Nach Azathioprin-Pulsinjektion ist die Radioaktivität mit 8,11 µCi/g etwas erhöht gegenüber den Kontrollen, der Markierungsindex leicht vermindert (7,48%), die Silberkorndichte wiederum reduziert auf 38,6%.

Abb. 17 a:

Versuchsanordnung A
Silberkorndichte über markierten Hepatozyten-Kernen 20 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie und Pulsinjektion der o.g. Cytostatika.

^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion i.p. 1 Stunde vor Tötung.

Abb. 17 b:

Versuchsanordnung A
^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Hepatozyten 20 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.

Versuchanordnung und -zeitpunkt wie Abb. 17 a.

Abb. 17 c:

Versuchsanordnung A
Radioaktivität pro Gramm Lebertrockengewicht (µCi/g) 20 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie.

Versuchansordnung und -zeitpunkt wie Abb. 17 a und b.

Abb. 17 a:

Silberkorndichte

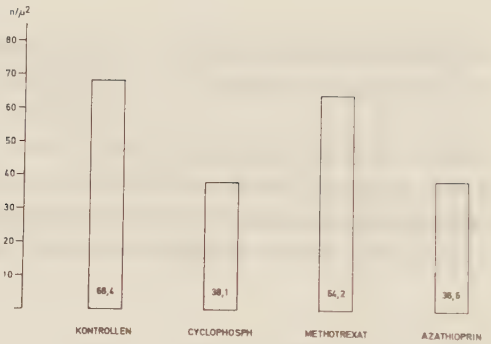


Abb. 17 b:

Markierungsindex

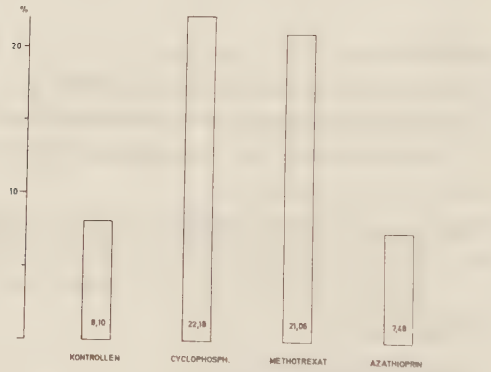
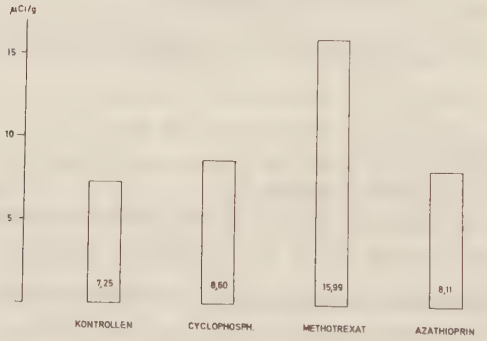


Abb. 17 c:

Radioaktivität



4.2. Versuchsanordnung B

4.2.1. Zellzahl pro Blickfeld

Abbildung 18 zeigt die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld ($n/10^2\mu^2$) nach Teilhepatektomie, anschließender 3-tätiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion sowie Applikation der Cytostatika als Pulsinjektion oder Dauerinfusion.

Unter Cyclophosphamid-Dauerinfusion ist dieser Wert für die Hepatozyten deutlich erhöht gegenüber den Kontrollen, nach Pulsinjektion des gleichen Medikaments scheint diese Erhöhung weniger ausgeprägt.

Unter Methotrexat ist die Anzahl der Hepatozyten pro Blickfeld gegenüber den Kontrollen leicht reduziert, diese Verminderung ist nach Azathioprin noch deutlicher, wobei jeweils die tägliche Pulsinjektion einen etwas stärkeren Effekt zu haben scheint.

Die Anzahl der Sinuswandzellen pro Blickfeld wird in dieser Versuchsanordnung durch die Cytostatika-Applikationen kaum merklich verändert im Vergleich zu Kontrollen.

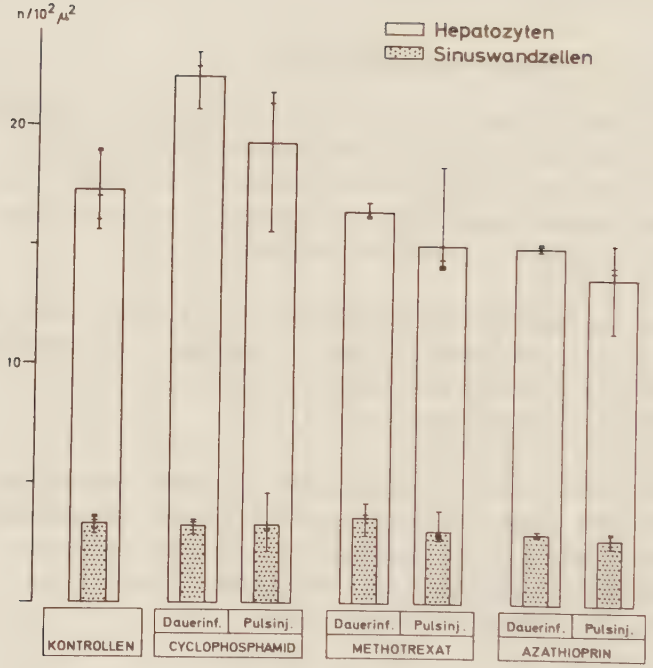


Abb. 18:

Versuchsanordnung B

Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld nach 2/3-Teilhepatektomie und anschließender 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion.

Applikation von:
1. Cyclophosphamid (60 mg/kg/d) oder
2. Methotrexat (1,3 mg/kg/d) oder
3. Azathioprin (25 mg/kg/d)

als Dauerinfusion oder tägliche Pulsinjektion.

4.2.2. Markierungsindex der Hepatozyten im Vergleich zur gemessenen Radioaktivität

Abbildung 19 a zeigt den Markierungsindex der Hepatozyten nach 2/3-Teilhepatektomie und anschließender 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion sowie gleichzeitiger Verabreichung der verwendeten Cytostatika als Dauerinfusion oder tägliche Pulsinjektion (Versuchsanordnung B).

Abbildung 19 b zeigt die jeweils zugehörige gemessene bzw. berechnete Radioaktivität in Mikrocurie pro Gramm Lebertrockengewicht.

Der Markierungsindex der Hepatozyten bei Kontrolltieren liegt unter den Bedingungen der Versuchsanordnung B bei 90,37%.

Cyclophosphamid und Methotrexat lassen in beiden Applikationsformen den Markierungsindex der Hepatozyten scheinbar weitgehend unbeeinflußt gegenüber Kontrollen, was bedeutet, daß die "growth fraction", d.h. der Anteil noch proliferationsfähiger und -bereiter Zellen, durch diese Medikamente kaum beeinflußt wird.

Die verminderte Radioaktivität unter Cyclophosphamideinwirkung ist jedoch Hinweis auf eine verminderte bzw. verzögerte DNS-Synthese. Dabei besteht kein nennenswerter Unterschied zwischen dem Effekt der Dauerinfusion (37,88 µCi/g) und der Pulsinjektion (39,38 µCi/g) des Cytostatikums.

Methotrexat läßt als Dauerinfusion und Pulsinjektion sowohl den Markierungsindex als auch die Radioaktivität praktisch unbeeinflußt. Beide liegen jeweils in der Größenordnung der Kontrollen.

Nur Azathioprin vermindert die growth fraction, besonders stark in der Applikation als Dauerinfusion (Markierungsindex 64,47%). Da gleichzeitig die Radioaktivität der Präparate gegenüber den Kontrollen stark vermindert ist, scheint Azathioprin einen Teil der Zellen am Übergang von der Funktionsphase G_0 in die Proliferationsphase zu hindern, wobei ebenfalls die Dauerinfusion wirksamer ist: sie vermindert die Radioaktivität pro Gramm Lebertrockengewicht von 57,57 µCi/g (Kontrollen) auf 18,77 µCi/g, die Pulsinjektion senkt die Radioaktivität auf 37,72 µCi/g.

Abb. 19 a:

Versuchsanordnung B

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Hepatozyten nach 2/3-Teilhepatektomie und anschließender 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion.

Applikation von:
1. Cyclophosphamid (60 mg/kg/d) oder
2. Methotrexat (1,3 mg/kg/d) oder
3. Azathioprin (25 mg/kg/d)

als Dauerinfusion oder tägliche Pulsinjektion.

Abb. 19 b:

Versuchsanordnung B

Radioaktivität pro Gramm Lebertrockengewicht (µCi/g). Versuchsanordnung und -zeitpunkt wie Abb. 19 a.

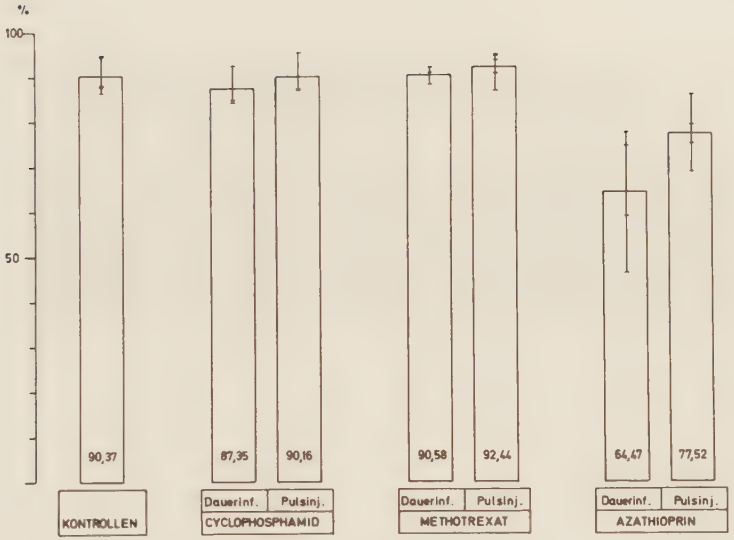


Abb. 19 a:
Hepatozyten-Markierungsindex

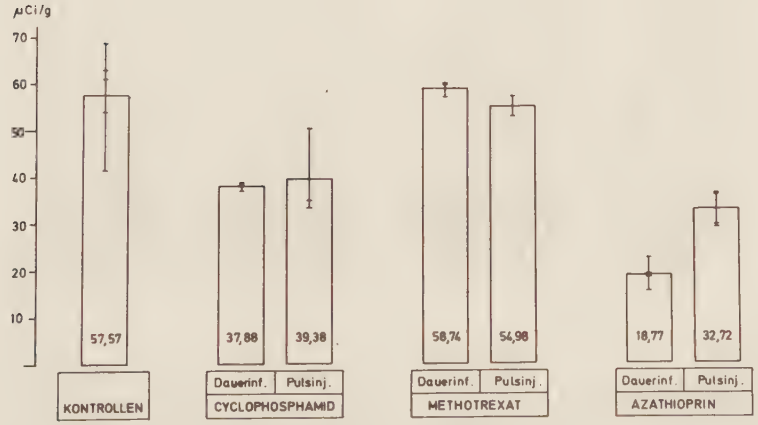


Abb. 19 b:
Radioaktivität pro g Lebertrockengewicht

4.2.3. Markierungsindex der Sinuswandzellen und Gallengangsepithelien

Bei den Sinuswandzellen (Abb. 20) verursachen die verwendeten Cytostatika ebenfalls nur eine unwesentliche Verminderung des Markierungsindex nach Teilhepatektomie. Nur durch Azathioprin, besonders als Dauerinfusion, wird dieser Wert deutlich reduziert im Vergleich zu Kontrollen.

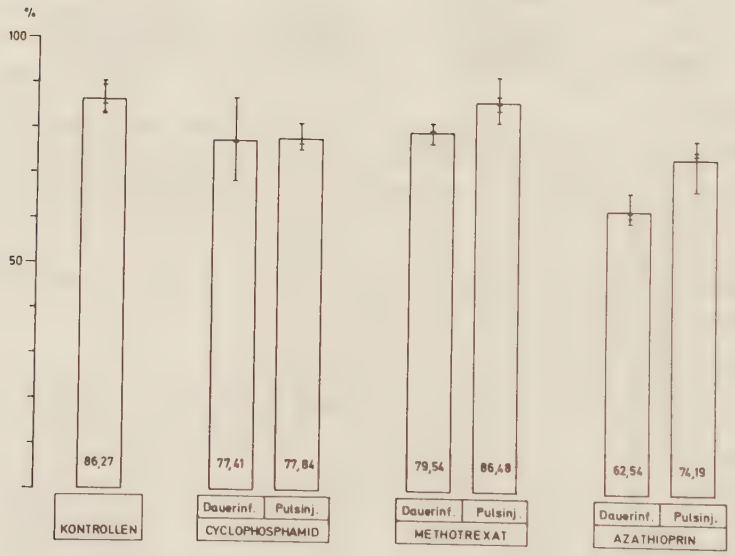


Abb. 20:

Versuchsanordnung B

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Sinuswandzellen.

Versuchsanordnung und -zeitpunkt wie Abb. 19.

Der Markierungsindex der Gallengangsepithelien (Abb. 21) wird gegenüber Kontrolltieren (87,2%) nach täglicher Cyclophosphamid-Pulsinjektion reduziert, in stärkerem Maß nach Cyclophosphamid-Dauerinfusion. Nach Methotrexateinwirkung ist die Veränderung des Markierungsindex in den Gallengangsepithelien gering. Besonders stark vermindert ist der Markierungsindex unter Azathioprin-Pulsinjektion (auf 40,3%) und -Dauerinfusion (auf 17,3%).

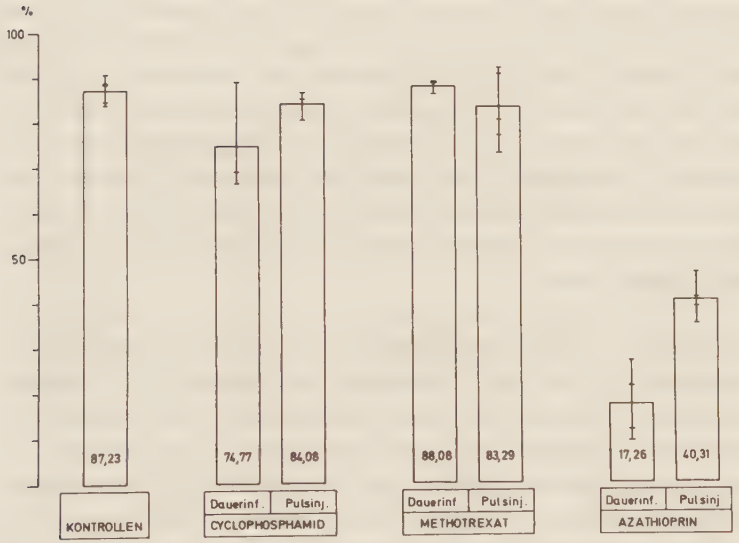


Abb. 21:

Versuchsanordnung B

^{3}H-Thymidin-Markierungsindex der Gallengangsepithelien.

Versuchsanordnung und -zeitpunkt wie Abb. 19.

V. DISKUSSION

5.1. Der zeitliche Ablauf der Leberparenchym-Regeneration nach Teilhepatektomie

Die Hepatozyten bilden ca. 90 - 95% der Leberzellmasse, aber nur 60 - 65% der Zellzahl (Lit. bei BUCHER 1963). Die Anzahl der Hepatozyten pro Blickfeld ist ein grober Hinweis auf Veränderungen der Zellgröße, da während der Leberregeneration keine Lockerung oder Auflösung des Zellverbandes stattfindet. In unserer Versuchsanordnung A erreicht dieser Wert bei Kontrolltieren ein Minimum, also die durchschnittliche Zellgröße ein Maximum bei 32 Stunden (vgl. Abb. 3). Nach BUCHER und MALT (1971) beginnen Zell-, Kern- und Nukleolenvergrößerung 6 - 12 Stunden nach Teilhepatektomie und erreichen ihr Maximum bereits 24 Stunden postoperativ. Die licht- und elektronenmikroskopischen Veränderungen, die dieser Vergrößerung zugrunde liegen, sind teils degenerativer, teils reparativer Natur (ALTMANN 1966).

Der Markierungsindex der Hepatozyten erreicht in unserer Versuchsanordnung A zur 24. Stunde ein Maximum von nur 12,76%. Möglicherweise könnte durch den vierstündigen Abstand der Beobachtungszeitpunkte ein eventuell dazwischenliegendes höheres Maximum einer Beobachtung entgehen. Der Kurvenverlauf insgesamt entspricht jedoch den Ergebnissen früherer Untersuchungen. FABRIKANT (1969) fand bei 3-stündiger radioaktiver Versuchszeit ein Maximum des Markierungsindex (44%) 25 Stunden nach Teilhepatektomie (s.a. BUCHER 1963, ALTMANN 1966).

Nach ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion während 72 Stunden (Versuchsanordnung B) sind bei den verwendeten, eben ausgewachsenen (2 - 3 Monate alten) Kontrolltieren 90,37% der Hepatozyten-

kerne markiert (Abb. 19), was annähernd dem von STÖCKER und HEINE (1971) gefundenen Wert von 93% entspricht. Dabei zeigt sich ebenso wie bei ^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion die bevorzugte Lokalisation der "non-growth-fraction" im Läppchenzentrum, entsprechend einer schlechteren nutritiven Situation rund um die Zentralvene (STÖCKER et al. 1972, BUCHER 1963, FABRIKANT 1969). Da mit der 3-tägigen ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion alle Zellen markiert werden, die während dieser Zeit in die DNS-Synthese eingetreten sind, kann aus dem Abstand zwischen dem Markierungsindex-Plateau und dem 100%-Wert direkt auf den Umfang der non-growth-fraction geschlossen werden (STÖCKER et al. 1972).

Der Mitoseindex der Hepatozyten (Abb. 6) ist 20 Stunden postoperativ in unserer Versuchsanordnung A eben meßbar, um dann zu einem Maximum bei 32 Stunden (ca. 4%) anzusteigen. Somit beginnt die Mitose etwa 8 Stunden nach Beginn der DNS-Synthese, die Höhepunkte des Markierungs- und Mitoseindex liegen ebenfalls 8 Stunden auseinander (STÖCKER und BACH 1965, KLINGE und MATHYL 1969, BUCHER und MALT 1971). Markierte Mitosen waren in dieser Versuchsanordnung nicht nachweisbar, da die radioaktive Versuchszeit, d.h. die Zeit zwischen Injektion von ^{3}H-Thymidin und Tötung der Versuchstiere, nur 1 Stunde betrug und damit kleiner war als die Dauer der postsynthetischen Interphase G_2.

5.2. Mögliche Angriffspunkte im Zellzyklus der Hepatozyten

5.2.1. Cyclophosphamid

Die Wirkung aller alkylierenden Substanzen, auch Radiomimetika genannt, besteht in einer Übertragung labiler Alkylreste auf Nukleinsäure-Untereinheiten, die durch diese Verknüpfung oder einfache Alkylierung und damit Quaternisierung funktionell geschädigt werden (KUSCHINSKY 1974).

Cyclophosphamid zeigt in vitro bei Inkubation mit Tumorzellen keine cytostatische Wirksamkeit. Nach in vivo Applikation an Ratten läßt sich im Serum der Versuchstiere eine cytostatisch aktive Verbindung nachweisen (Lit. b. GRUNICKE, LIERSCH, HOLZER und ARNOLD 1965). Der Mechanismus dieser Aktivierung ist noch unklar, möglicherweise findet eine Spaltung des Esteramidringes statt.

Klinische Verwendung findet Cyclophosphamid als Cytostatikum u.a. bei Morbus HODGKIN sowie chronisch lymphatischer oder myeloischer Leukämie.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Leberzellen von Ratten nach Verabreichung einer Einzeldosis Cyclophosphamid i.p. stellen sich nur unspezifische Zellveränderungen dar, die von kurzer Dauer sind, wie Dilatation des rauhen endoplasmatischen Retikulums, Ribosomenaggregationen, diffuse Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Retikulums (LAVIN und KOSS 1971). Nekrosen treten an Leberparenchymzellen nicht auf, im Gegensatz zu Nierentubulus- oder Blasenepithelzellen. Den Grund hierfür sehen diese Autoren in der reichlichen Ausstattung der Leberparenchymzelle mit metaboli-

sierenden Enzymen (unspezifische Oxygenasen etc.). HEGEWALD und BÄRENWALD (1972) fanden nach Cyclosphosphamid eine histochemisch verifizierbare Verminderung der DNS-Synthese, was für eine insgesamt verminderte Eiweißsynthese und damit auch für einen reduzierten Aufbau von Enzymproteinen spricht. Eine gleichzeitig beobachtete Verringerung des glatten endoplasmatischen Retikulums deutet nach Ansicht der gleichen Autoren weniger auf einen Induktionseffekt, sondern ebenfalls auf eine Verminderung der Proteïnsynthese hin. Über Chromosomenaberrationen am Knochenmark von Ratten nach oraler Applikation von Cyclophosphamid berichten PAYNE, NELSON und WEIKEL (1974). Diese Veränderungen scheinen eher Ausdruck einer direkten toxischen Zellschädigung und weniger Hinweis auf erfolgte Genmutationen zu sein, da die Zahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen in den folgenden Generationen nicht ansteigt. Auch Entwicklungsstörungen an Schneidezähnen von Ratten nach einer Einzeldosis von 75 mg Cyclophosphamid i.p. wurden beobachtet (REICHART und ALTHOFF 1980).

20 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie und Cylcophosphamid-Pulsinjektion beträgt der Markierungsindex der Hepatozyten in unserer Versuchsanordnung A beinahe das 3-fache der Kontrollwerte. Dieser Befund spricht eher für eine Verzögerung als für eine Stimulation der DNS-Synthese, da gleichzeitig das Maximum des Mitoseindex um 4 Stunden verzögert ist gegenüber den Kontrollen (Abb. 5, 6, 7, 8), die einer Mitose vorausgehenden DNS-Syntheseprozesse, eventuell auch der Übertritt von G_0 zu G_1, also verzögert ablaufen müssen. Dafür sprechen auch die nach Cyclophosphamid verminderte Radioaktivität pro Gramm Lebertrockengewicht und die verminderte Silberkorndichte über den markierten Hepatozytenkernen (Abb. 17). Ein von anderen Autoren (s.u.) ermittelter

G_2-Block konnte in unserer Versuchsanordnung nicht bestätigt werden, da der 24-Stunden-Wert des Mitoseindex durch Cyclophosphamid nicht vermindert wurde gegenüber den Kontrollen. Auch nach ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion (Abb. 19) verursacht Cyclophosphamid keine nennenswerte Verringerung des Markierungsindex bzw. der "growth fraction", reduziert jedoch deutlich die gemessene Radioaktivität.

Nach PALME, LISS und WIEBEL (1963) scheint der Angriffsort von Cyclophosphamid im Zellzyklus des Dünndarmepithels von Versuchstieren dosisabhängig zu sein. Diese Autoren beobachteten bei steigender Dosis von i.p. appliziertem Cyclophosphamid (0 - 150 mg/kg) einen praktisch unveränderten ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex, einen schon bei niedriger Dosierung abfallenden Prozentsatz markierter Mitosen als Hinweis auf eine verzögerte und gegenüber exogenen Noxen sensible G_2-Phase, sowie eine erst bei höherer Dosierung sichtbare Verminderung der Silberkorndichte über den markierten Kernen als Ausdruck einer direkten Störung der S-Phase. Aus dem unveränderten Markierungsindex wurde auf eine Stabilität der Relation von G_1 und S geschlossen. Andere Autoren (IWATA und OTA 1968, HOFFMAN und POST 1972, GRISHAM 1973) kamen zu dem Ergebnis, daß alkylierende Substanzen vornehmlich die Zellteilung, weniger die DNS-Synthese unterdrücken. Nach den Beobachtungen von IWATA und OTA bewirkt Cyclophosphamid, zu verschiedenen Zeiten vor und nach Teilhepatektomie verabreicht, eine Beschleunigung der DNS-Synthese, erkennbar am Anstieg des Markierungsindex, woraus auf einen negativen feed-back-Mechanismus der DNS-Synthese bei gleichzeitiger Teilungsstörung zu schließen sei. Auch eine Verlängerung von G_2 wird diskutiert. Einzeldosen von Cyclophosphamid (10 - 20 mg/kg) führen zur Regression von Plasmozytomen bei Hamstern

und zur Abnahme der DNS- und RNS-Syntheserate der Tumoren bei autoradiographischen Untersuchungen (WHEELER und ALEXANDER 1969). Die maximale Synthesehemmung trat 24 - 48 Stunden nach Verabreichung des Medikaments auf. Ein Aktivitätsverlust der DNS-Nukleotidyltransferase war in den Tumorzellen nachweisbar. Auch bei resistenten Tumoren ließ sich eine Regression durch höhere Dosierung erzielen. Die geringe Halbwertszeit einer Einzeldosis von Cyclophosphamid macht eine direkte Hemmung der Nukleotidyltransferase unwahrscheinlich. Die beobachtete Verminderung der DNS-Synthese führen diese Autoren eher auf eine verringerte Zahl DNS synthetisierender Zellen zurück als auf eine Hemmung der DNS-Synthese an sich. Möglicherweise werden die Zellen am Durchlaufen anderer Zyklusphasen gehindert, etwa der G_2-Phase (BASERGA 1969, Lit. b. WHEELER und ALEXANDER 1969). HOFFMAN und POST (1972) beobachteten nach Verabreichung von Stickstofflost einen unveränderten Interphase-Markierungsindex an Ileumkryptenzellen der Ratte, jedoch eine Abnahme des Mitoseindex, was auf eine Verzögerung in S oder einen Block in G_2 hinweist. Nach GRISHAM (1973) verlangsamt die gleiche Substanz sowohl den Eintritt der Zelle in die Mitose als auch die Passage durch die Mitose. Unmittelbar nach Teilhepatektomie appliziert, verursacht Cyclophosphamid an der regenerierenden Rattenleber eine Behinderung der Mitose hauptsächlich in der Metaphase, ferner Mitoseanomalien und Kernveränderungen (MIETKIEWSKI, KARON und WARCHOL 1973). Als Angriffspunkte werden die Alkylierung von doppelsträngiger DNS, Läsionen des Spindelapparates, Schädigung der Lysosomenmembran, gefolgt von Cytolyse, ferner Hemmung eines die Leberregeneration stimulierenden humoralen Faktors diskutiert. 4 Tage nach Unterbrechung einer mehrtägigen Cyclophosphamid-Zufuhr zeigen sich im Leberparenchym Nekrosenherde, die eventuell aus anomalen Zellteilungsvorgängen stammen. Solche

Chromosomenveränderungen scheinen die Lebensdauer der Zellen herabzusetzen.

5.2.2. Methotrexat

Der Folsäureantagonist Methotrexat (N^{10}-Methyl-Aminopterin) verhindert durch Hemmung der Thymidylat-Synthetase und der Dihydrofolsäurereduktase die Bildung von Folat-Coenzymen, die für die Biosynthese von Purinnukleotiden notwendig sind. Außerdem soll es die Mitose zwischen Metaphase und Anaphase blockieren, also zu einer Verlängerung der Metaphase führen (BUDDECKE 1971).

Klinische Verwendung findet Methotrexat zur Erzielung meist kurzfristiger Remissionen bei akuter Leukämie im Kindesalter, zur systemischen Behandlung schwerer Formen der Psoriasis vulgaris, auch zur lokalen Tumortherapie mit intraarterieller Perfusion. Die Tumorregression ist in diesen Fällen allerdings ebenfalls von nur kurzer Dauer (Lit. b. DALEN, OFTEBRO und ENGESET 1965). Unspezifische Leberzellschädigungen unter Methotrexat-Therapie können nicht eindeutig auf das Medikament bezogen werden, da sie auch bei unbehandelten Patienten auftraten und daher eher als Symptom der Grundkrankheit betrachtet werden müssen (ZACHARIAE und SCHIØDT 1971).

Bezüglich der hemmenden Wirkung von Methotrexat auf die Leberregeneration werden nicht immer übereinstimmende Ergebnisse ermittelt.

Die spezifische Aktivität von DNS in der regenerierenden

Rattenleber nach einer Einzeldosis Methotrexat läßt keine statistisch signifikante Senkung erkennen (MESCHAN und CASTELLS 1964).

Die ursprünglich angenommene teilweise Unterdrückung der Leberregeneration (Lit. b. BROWN, NEAL und WILLIAMS 1965), wobei das Lebergewicht als Maßstab des Wachstums gewertet wurde, ließ sich in späteren Experimenten nicht reproduzieren. Mit verschiedenen Applikationsmustern und auch mit akut toxischen Dosen ließ sich kein deutlicher wachstumshemmender Effekt auf die Restleber erzielen (BROWN, NEAL und WILLIAMS 1965). Nach diesen Autoren wird auch die Dihydrofolat-Reduktase durch Methotrexat kaum beeinflußt, während Folat-Reduktase in größerem Ausmaß gehemmt wird (NGU, ROBERTS und HALL 1964). Die unbehinderte Dihydrofolat-Reduktase wäre eine Erklärung für den geringen Einfluß von Methotrexat auf die Leberregeneration.

Methotrexat blockiert an lebenden Zellen die Umwandlung von Desoxyuridylsäure zu Thymidylsäure. Über die Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase gibt es widersprüchliche Ergebnisse mit der gemeinsamen Schlußfolgerung, daß Methotrexat die Leberregeneration nicht hemme (Lit. b. COWARD, MORSE und GENTRY 1968; GERSHBEIN und PEDROSO 1968). COWARD et al. beobachteten jedoch eine deutliche Hemmung der Leberregeneration (gemessen in % des ursprünglichen Lebergewichtes) nach Verabreichung von 1 g Methotrexat i.p. pro Versuchstier 12 Stunden nach Teilhepatektomie und führen das von anderen Autoren abweichende Ergebnis auf unterschiedliche Applikationsschemata zurück.

Ca. 12 Stunden nach 2/3-Teilhepatektomie an Ratten beginnt die vermehrte Synthese der Thymidinkinase, Thymidylatkinase, Thymidylat-Synthetase, DNS-Polymerase und Desoxycytidylat-Desaminase, also der Folat-abhängigen Enzyme der Purin-Biosynthese (LABOW und MALEY 1969). Die i.p.-Injektion von je 0,5 mg Methotrexat zum Zeitpunkt der Teilhepatektomie sowie 24 Stunden später behindert die Synthese aller oben genannten Enzyme mit Ausnahme der Thymidylat-Synthetase, die deutlich stimuliert wird. Ähnliche Ergebnisse ermittelte NEWBOLD (1973). Bei der chromatographischen Untersuchung der Verteilung intrazellulärer Folsäurederivate nach Methotrexat-Applikation gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine Akkumulation von Dihydrofolsäure, wie sie eigentlich nach Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase zu erwarten wäre (Mc BURNEY und WHITMORE 1975).

Nach HRYNIUK, FISCHER und BERTINO (1969) ist die Wirkung von Methotrexat auf Zellwachstum abhängig von der Kinetik der Zellproliferation: auf logarithmisch wachsende Zellkulturen von L 5178 Y - Leukämiezellen zeigt Methotrexat einen vielfach stärkeren Hemmeffekt (bezüglich des ^{3}H-Thmidin-Einbaus und des ^{3}H-Desoxyuridin-Einbaus in die DNS) im Vergleich zu ruhenden Kulturen der gleichen Zellart.

Nach den Ergebnissen unserer Versuchsanordnung A führt Methotrexat am wahrscheinlichsten zu einer Verzögerung der Mitose. Dies zeigt die gegenüber Kontrolltieren scheinbare Vermehrung der Mitosen 24 Stunden nach Teilhepatektomie (Abb. 6, 10). Eine Häufung pathologischer Mitosen nach Methotrexat fanden KLINGE, HEINE und RÖSCHLAU (1973) mit der gleichen Versuchsanordnung. Dies ist gleichbedeutend mit einer Mitose-Verzögerung,

deren Ursache - z.B. bei senilen Ratten - in einer verlängerten G_2-Phase liegt (HEINE und STÖCKER 1970). In der Versuchsanordnung B werden der Markierungsindex der Hepatozyten (Abb. 19a), die Radioaktivität pro g Lebertrockengewicht (Abb. 19b), der Markierungsindex der Sinuswandzellen (Abb. 20) und der Gallengangsepithelien (Abb. 21) durch Methotrexat in beiden verwendeten Applikationsformen (Dauerinfusion oder tägliche Pulsinjektion) nicht merklich verändert gegenüber Kontrolltieren. Die "growth-fraction" der in der Leber vorkommenden Zellarten wird demnach durch dieses Cytostatikum nicht vermindert. Möglicherweise hat die ^3H-Thymidin-Dauerinfusion einen Schutzeffekt, der normal proliferierendes Gewebe gegen die Toxizität von Methotrexat abschirmt. Diese Möglichkeit einer verstärkt selektiven Antitumor-Wirkung von Methotrexat wird in neueren Arbeiten diskutiert (Lit. bei MARTIN et al. 1980).

Bei autoradiographischen Untersuchungen am Ileum der Ratte (HOFFMAN und POST 1972) führt Methotrexat zu einem Anwachsen des Markierungsindex, bei gleichzeitiger Abnahme des Mitoseindex, was von den Autoren als Hinweis auf eine Blockierung des Zellzyklus in der G_2-Phase gedeutet wird. Histologisch zeigt sich in diesen Versuchen eine Abflachung der Dünndarmzotten ohne Nekrosen.

DALEN, OFTEBRO und ENGESET (1965) fanden an menschlichen Leberzellkulturen vom Chang-Stamm eine Abnahme des Mitoseindex ca. 6 Stunden nach Methotrexat-Einwirkung, woraus sie eine Verzögerung im Ablauf von S oder G_2 ableiteten.

Untersuchungen an L 1210 - Leukämiezellen (GONCHAROVA und FRANKFURT 1976) kommen zu dem Ergebnis, daß diese

Zellart ihre höchste Empfindlichkeit gegenüber Methotrexat in der G_1- und der S-Phase hat (s.a. CAMERON 1973). Hierbei soll Methotrexat jedoch nicht den Übergang von der späten S-Phase durch die G_2-Phase zur Mitose behindern. Nach den Ergebnissen anderer Autoren (Lit. b. GONCHAROVA und FRANKFURT 1976) wird die Behinderung der RNS- und Proteinsynthese durch Methotrexat als Ursache für eine Störung des G_1-S-Überganges und akute Zelldegeneration genannt.

5.2.3. Azathioprin

Der Purinantagonist Azathioprin greift hemmend in die Nukleinsäure-Synthese ein. Azathioprin findet klinisch Verwendung besonders zur Immunosuppression bei Autoimmunerkrankungen und nach Organtransplantationen. Sein Einfluß speziell auf die Leberregeneration und Leberfunktion ist von klinischem Interesse wegen seiner Verwendung in der Therapie der chronisch aggressiven Hepatitis und für den Fall, daß in Zukunft die Lebertransplantation an Bedeutung gewinnen sollte (THOMFORD, ZACHMAN und PATTI 1971). Es ist nicht sicher, ob der Angriffspunkt allein in der Proliferationshemmung der immunkompetenten Lymphozyten liegt, oder ob auch hemmende Wirkungen an den Bindegewebszellen in der Peripherie anzunehmen sind (MATHIES 1979).

Eine nicht endgültig bewiesene, aber nach beobachteten Chromosomenaberrationen an menschlichen Knochenmarkszellen mögliche carcinogene Wirkung von Azathioprin mahnt zu äußerst strenger Indikationsstellung in der Klinik bei der Behandlung nicht neoplastischer Erkrankungen (JENSEN und SØBORG 1966). Andererseits kann das

Risiko der Tumorentwicklung oder Mutagenität unter Azathioprin-Behandlung nicht eindeutig vom gleichen Risiko durch die Grundkrankheit selbst, wie Autoimmunerkrankung oder Urämie, unterschieden werden (Lit. b. MORNINGTON 1977).

Bei Verwendung biochemischer Parameter wie z.B. des Stickstoffgehaltes pro g Leberfeuchtgewicht oder des Fettgehaltes pro 100 g Leberfeuchtgewicht als Maßstab der Leberegeneration nach Teilhepatektomie findet man zwischen oral Azathioprin-behandelten Versuchstieren und unbehandelten Kontrolltieren keine Unterschiede, ebensowenig bei histologischer Untersuchung des Lebergewebes (PERINGS, HUNSTEIN und SCHUMANN 1971).

Dagegen fanden THOMFORD et al. (1971) an teilhepatektomierten Ratten nach täglicher i.p. Verabreichung von Azathioprin eine deutlich geringere Leberregeneration (gemessen in % des berechneten ursprünglichen Lebergewichtes) im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren. Nach Untersuchungen von GONZALEZ et al. (1970) an der regenerierenden Rattenleber unter Azathioprin-Behandlung ist die Wiederherstellung des Lebergewichtes nicht beeinträchtigt, die DNS-Synthese (gemessen als spezifische Aktivität von DNS nach ^{3}H-Thymidin-Einbau) ist jedoch schon am ersten Tag nach Teilhepatektomie um den Faktor 100 gegenüber Kontrollen vermindert. Die DNS-Konzentration nimmt um ca. 24% nach 2 Tagen und um 38% nach 4 Tagen ab im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Mikroskopisch zeigen sich nach Azathioprin Kernveränderungen mit randständigem Chromatin, ferner Zellvergrößerung.

Nach Absetzen auch einer längerdauernden Azathioprin-Applikation wird die unterdrückte DNS-Synthese schon

nach 24 Stunden wieder aufgenommen, das regeneratorische Potential ist also nicht dauernd erschöpft, eine Tatsache, die beim klinischen Einsatz von Azathioprin die Möglichkeit eines Dosierungsplanes mit geringerer Schädigung normal proliferierender Gewebe eröffnen könnte (VAN VROONHOVEN und MALT 1971, VAN VROONHOVEN, MALAMUD und MALT 1972).

Nach KORT und VAN DER POST (1973) behindert Azathioprin die Leberregeneration in geringem Umfang, wenn man als Parameter der Funktion die Prothrombinaktivität und Bromthaleinretention, als Parameter der Gewichtsregeneration das Trocken- und Feuchtgewicht der Leber sowie die Zellzahl in einem mikroskopischen Areal verwendet. Die Reversibilität der Azathioprinwirkung wird auch von diesen Autoren für alle gemessenen Werte bestätigt.

In unserer Versuchsanordnung A (^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion) hat die Anzahl der Hepatozyten pro Blickfeld ein deutliches Minimum 28 Stunden postoperativ (Abb. 3). Da keine Auflösung des Parenchymzellverbandes erfolgte, muß dies als Hinweis auf Zellhypertrophie - zumindest während der ersten Regenerationszyklen - angesehen werden. Auch nach 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion (Versuchsanordnung B, Abb. 18) zeigt die Verminderung der Zellzahl pro Flächeneinheit nach Azathioprin eine Tendenz zur Zellschwellung an.

Der Markierungsindex der Hepatozyten 20 Stunden postoperativ liegt nach einmaliger Azathioprin-Pulsinjektion (Abb. 11, 17b) im Bereich der Kontrollen. Der Eintritt in die S-Phase scheint also durch Azathioprin in dieser Applikation nicht gestört zu werden. Die Silberkorndichte über markierten Hepatozyten-Kernen ist jedoch auf fast die Hälfte reduziert (Abb. 17a), auch die Radioaktivität

pro g Lebertrockengewicht (Abb. 17c) liegt niedrig, was für eine zwar stattfindende, in ihrem Ausmaß jedoch gehemmte DNS-Synthese spricht. Nach 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion (Abb. 19a, b) zeigt Azathioprin als einziges der untersuchten Medikamente eine Verminderung der "growth-fraction", also des erreichten Hepatozyten-Markierungsindex, scheint demnach einen Teil der Zellen am Übergang von der Funktionsphase G_0 in die Proliferationsphase hindern zu können. Parallel dazu geht eine deutlich reduzierte Radioaktivität pro g Lebertrockengewicht. Die Dauerinfusion von Azathioprin ist hier die effektivere Applikationsform. Entsprechendes gilt für den Markierungsindex der Sinuswandzellen (Abb. 20) und Gallengangsepithelien (Abb. 21).

Der Mitoseindex der Hepatozyten ist 24 Stunden nach Teilhepatektomie und Azathioprin-Pulsinjektion noch sehr niedrig (Abb. 12), das Maximum liegt ebenfalls unter dem der anderen untersuchten Tiergruppen. Somit käme als Angriffspunkt dieses Medikaments auch die einer Mitose vorausgehende G_2-Phase in Frage.

Untersuchungen von EPIFANOVA et al. (1978) zeigen, daß Azathioprin im Gegensatz zu anderen Cytostatika Stoffwechselvorgänge und Enzyme auch in nicht proliferierenden G_0-Zellpopulationen behindern kann. MALAMUD et al. (1972) fanden in autoradiographischen Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber nach Azathioprin (40 mg /kg p.o.) eine Unterdrückung der DNS-Synthese: der Markierungsindex, gemessen von 0 - 96 Stunden nach Teilhepatektomie, steigt nicht an, wohl aber der Mitoseindex zur 48. Stunde hin, wenn auch nur geringfügig. Demnach erhöht sich unter Azathioprin der Mitoseindex ohne vorherige Steigerung der DNS-Synthese, was die Existenz einer durch Azathiopin stimulierten G_2-Popula-

tion nahelegen könnte. Die gleichen Autoren beobachteten, daß die Silberkorndichte über den einzelnen markierten Leberparenchymzellen bei Azathioprin-behandelten Tieren kaum verändert war im Vergleich zu Kontrolltieren: die Hemmung der DNS-Synthese scheint also auf einer Verminderung der Zahl DNS synthetisierender Zellen zu beruhen, weniger auf einer DNS-Synthesehemmung pro Einzelzelle. In unserer Versuchsanordnung A verursacht jedoch eine Einzelinjektion von Azathioprin eine Verminderung der Silberkorndichte 20 Stunden postoperativ, was bedeutet, daß zumindest zeitweise die DNS-Synthese pro Einzelzelle reduziert ist (Abb. 17a).

Die durchschnittliche Zunahme des Hepatozyten-Durchmessers bei Azathioprin-behandelten Tieren zeigt, daß die Leberregeneration unter Azathioprin-Einwirkung mehr durch Hypertrophie(=funktionelle Vergrößerung der Einzelzelle) erfolgt als durch Hyperplasie (= Zellvermehrung) (MALAMUD et al. 1972, RYABININA et al. 1975). Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein (Abb. 3, 18).

Tabelle 4 zeigt im Vergleich mit den eigenen Untersuchungen die von anderen Autoren ermittelten diskutablen Angriffspunkte von Cyclophosphamid, Methotrexat und Azathioprin im Zellzyklus.

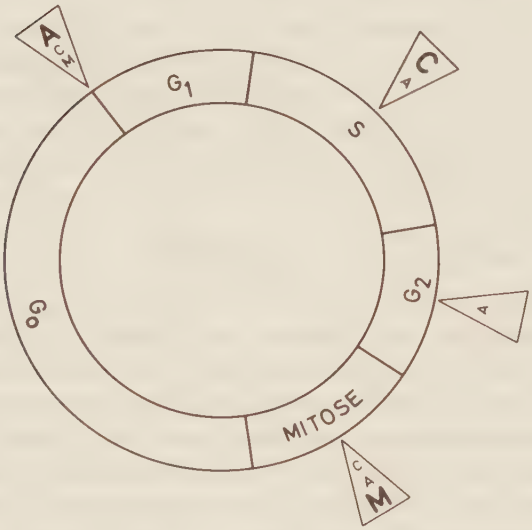
Tab. 4:

Angriffspunkte von Cyclophosphamid, Methotrexat und Azathioprin im Zellzyklus

Medikamente	Zyklusphase	Literatur
Cyclophos-phamid	G_2	BASERGA 1969 HOFFMAN und POST 1973
	G_2, S bei höheren Dosen	PALME, LISS und WIEBEL 1963 IWATA und OTA 1968 WHEELER und ALEXANDER 1969 HOFFMAN und POST 1972
	Übergang von G_0 zur Proliferation S Verzögerung des Mitoseablaufes	Eigene Ergebnisse
Methotrexat	G_2, S	DALEN, OFTEBRO und ENGESET 1965 s. HOFFMAN und POST 1973
	S	HRYNIUK, FISCHER und BERTINO 1969

	G_2	HOFFMAN und POST 1972
	Übergang von G_1 zu S	GONCHAROVA und FRANKFURT 1976
	Übergang von G_0 zur Proliferation	Eigene Ergebnisse
	M	
Azathioprin	S	VAN VROONHOVEN und MALT 1971 CAMERON 1973
	G_2	MALAMUD et al. 1972
	Übergang von G_0 zur Proliferation, M in ger. Maß, evtl. G_2,S	Eigene Ergebnisse

Die Abbildung 22 faßt die eigenen Beobachtungen bezüglich dieser Angriffspunkte zusammen.



C = Cyclophosphamid
M = Methotrexat
A = Azathioprin

Abb. 22

Mögliche Angriffspunkte der untersuchten Cytostatika im Zellzyklus.

5.3. Betrachtungen zur Zellkinetik der Sinuswandzellen bzw. Kupffer-Zellen

In der Gesamtheit der Sinuswandzellen haben die Kupffer-Zellen spezifische Funktionen (WISSE 1977, CARR 1977). Sie sind Makrophagen, die stark auf Fremdpartikel reagieren, wenn letztere einen Durchmesser von mehr als 0,1 µ haben (Latexpartikel, Bakterien, Zellen). Sie besitzen Mikrovilli, ihr rauhes endoplasmatisches Retikulum enthält Peroxidase. Ihre Bedeutung im Fettstoffwechsel ist unvollständig erforscht, aber wahrscheinlich, ebenso ihre Funktion beim Abbau von Erythrozyten.

5.3.1. Besonderheiten des Zellzyklus

FABRIKANT (1969) fand nach 2/3-Telhepatektomie die ersten markierten Sinuswandzellen 18 Stunden postoperativ, etwa 6 Stunden nach dem Auftreten der ersten markierten Hepatozyten. Ein steiler Anstieg des Markierungsindex der Sinuswandzellen setzt erst nach 24 Stunden ein, wenn der Markierungsindex der Hepatozyten bereits sein Maximum erreicht hat. Diesem Verhalten entsprechen die Ergebnisse der Versuchsanordnung A (Abb. 13), bei denen die Größenordnung des gefundenen Maximums (ca. 12%) 40 Stunden postoperativ den Werten anderer Autoren entspricht (FABRIKANT 1969, BUCHER und MALT 1971).

Die Beobachtung markierter Sinuswandzell-Mitosen war in der Versuchsanordnung A wegen der kurzen radioaktiven Versuchszeit von nur 1 Stunde nicht möglich, ebenso wenig wie bei den Hepatozyten.

HEINE und STÖCKER (1970) bestimmten die Teilphasen des

Zellzyklus bei Sinuswandzellen, speziell bei Kupffer-Zellen, nach der Methode von QUASTLER und SHERMAN. Demnach dauert bei senilen Ratten nach Teilheptektomie die S-Phase der Kupffer-Zellen im Mittel 9,2 Stunden (Hepatozyten: 8,4 Stunden), die Mitose im Mittel 1 Stunde (Hepatozyten: 1,5 Stunden), die minimale G_2-Dauer beträgt 1,5 Stunden (Hepatozyten: 2,5 Stunden), der gesamte Generationszyklus benötigt mindestens 23 Stunden (Hepatozyten: 17 Stunden). Die Funktionsphase G_0 dauert in Abhängigkeit vom Alter 40 - 100 Tage. Damit ist der Zellzyklus der Kupffer-Zellen anderen stabilen Geweben vergleichbar. Die kurze Mitosedauer ist die Ursache dafür, daß Mitosen von Kupffer-Zellen im histologischen Schnitt sehr schwer und selten zu beobachten sind (HEINE 1980).

5.3.2. Lokalisation und Ursachen der Kupfferzellproliferation

Die Frage nach der Herkunft der Kupffer-Zellen wird unterschiedlich beantwortet. FABRIKANT (1969) und BUCHER (1971) deuten die mögliche Unabhängigkeit der Regulationsmechanismen bei der Regeneration von Hepatozyten und Sinuswandzellen an: bei den nicht-parenchymalen Zellen sind DNS-Synthese und Mitose dem Zufall folgend über das ganze Leberläppchen verteilt, während diese Regenerationsprozesse bei Parenchymzellen in der Peripherie des Leberläppchens, also in der Nähe der Periportalfelder, am intensivsten sind, zumindest während der ersten postoperativen Regenerationszyklen. HEINE (1980) konnte zeigen, daß nach Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) die Regeneration der Hepatozyten verzögert, die der Sinuswandzellen jedoch ungestört beginnt, letztere also einem eigenen Regulationsmechanismus folgen. Neben intrahepatischer Regeneration der Kupffer-Zellen durch Teilung könnte auch eine Umwandlung von anderen Sinuswandzellen (Lit. b. BUCHER, 1963) den Verlust an Kupffer-Zellen nach 2/3-Teilhepatektomie ausgleichen. Ebenso ist die Einwanderung von Zellen des extrahepatischen retikuloendothelialen Systems in die Leber zur Deckung dieses Verlustes denkbar (FABRIKANT 1969; BUCHER und MALT 1971; VOLKMAN 1977; CARR 1977). Andere Autoren (Van FURTH et al. 1977) schließen aus biochemischen und funktionellen Ähnlichkeiten von Kupffer-Zellen und Peritonealmakrophagen auf eine ausschließliche Herkunft von Kupffer-Zellen aus mononukleären Vorstufen des Knochenmarks, was bedeutet, daß der Bestand an Kupffer-Zellen in der Leber ausschließlich durch zirkulierende Monozyten aufrechterhalten wird, die Kupffer-Zellen nach ihrem Einwandern in die Lebersinusoide nicht - oder höchstens noch einmal - zur weiteren DNS-Synthese und Zellteilung fähig sind.

Untersuchungen über die Proliferation von Kupffer-Zellen unter normalen und pathologischen Bedingungen (HEINE und STÖCKER 1970; HEINE 1980) kommen zu anderen Ergebnissen: Kupffer-Zellen sind mehrmals teilungsfähig. Die altersabhängige Abnahme des Markierungsindex unterscheidet sie deutlich von den monozytären Zellelementen des Knochenmarks, da letztere einen lebenslang etwa gleich hohen Markierungsindex haben.

In der Versuchsanordnung A (Abb. 4)ist die Anzahl der Sinuswandzellen in einer definierten Flächeneinheit von der 20. bis 40. Stunde nach Teilhepatektomie starken Schwankungen unterworfen sowohl bei den Kontrolltieren als auch nach Cytostatika-Applikation. Dieser Verlauf allein erlaubt keine Deutung bezüglich der Zellkinetik, da die Sinuswandzellen keinen Zellverband bilden, und die nicht endgültig geklärte Herkunft insbesondere der Kupffer-Zellen einen Einfluß auf die Zellzahl haben kann. Der gegenüber den Hepatozyten verzögerte Anstieg des Markierungsindex nach Teilhepatektomie (Abb. 13) könnte nach Ansicht früherer Untersucher (OEHLERT et al. 1962; FABRIKANT 1969) darauf hindeuten, daß die vermehrte Parenchymzellproliferation der adäquate Reiz für das Einsetzen der Sinuswandzellproliferation ist. Nach Cyclophosphamid (Abb. 14) zeigt sich ein gegenüber den Kontrolltieren nur geringfügig verzögerter Anstieg des Markierungsindex.
Nach Methotrexat (Abb. 15) weist der wellenförmige Verlauf des Markierungsindex mit mehreren Maxima und Minima möglicherweise auf eine besonders prompte Bioverfügbarkeit dieses Medikaments nach intravenöser Injektion hin (STUART et al. 1979). Nach einmaliger Pulsinjektion beim Menschen ist nach 24 Stunden der Methotrexat-Spiegel im Serum praktisch unmeßbar (FREEMAN-NARROD et al. 1975).

In der Versuchsanordnung B (^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion) zeigen Cyclophosphamid, Methotrexat und Azathioprin als Dauerinfusion wie auch als tägliche Pulsinjektion einen eher geringen suppressiven Effekt auf den Markierungsindex der Sinuswandzellen (Abb. 19), obwohl die Cytostatika in Dosierungen verabreicht wurden, die normalerweise die Regeneration von Knochenmarkszellen stärker hemmen würden (HEINE 1980). Auch diese Beobachtung macht eine lokale und vom Knochenmark unabhängige Proliferation der Kupffer-Zellen wahrscheinlicher. Lediglich durch Azathioprin, besonders in der Applikation als Dauerinfusion, wird der Markierungsindex auf bis zu 62% gesenkt gegenüber 86% bei Kontrollen. Auch die Anzahl der Sinuswandzellen pro Blickfeld (Abb. 17) wird nur durch Azathioprin auf weniger als 3 vermindert, durch Cyclophosphamid und Methotrexat hingegen nicht merklich beeinflußt gegenüber Kontrollen.

Nach neueren Untersuchungsergebnissen (CARR 1977) scheint die Kupffer-Zelle ein Makrophage mit intrahepatischer Proliferation zu sein. Unter Einwirkung eines starken, akuten Reizes, z.B. der 2/3-Teilhepatektomie, ist jedoch auch die Einwanderung von Zellelementen des Knochenmarks zur Deckung des schweren Zellverlustes denkbar. Die Zellkinetik der Kupffer-Zellen ist unter verschiedenen experimentellen Bedingungen unabhängig vom Leberepithel. Der Proliferationsreiz für die Kupffer-Zelle wird entweder durch die Blutbahn übertragen, etwa durch die vom Darm her transportierten Bestandteile des Pfortaderblutes, oder auch durch die Nekrosen von Leberparenchymzellen (HEINE 1980).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch autoradiographische Untersuchungen der Zellkinetik die Einwirkung einer täglichen Pulsinjektion bzw. Dauerinfusion von Cyclophosphamid, Methotrexat und Azathioprin auf die regenerierende Rattenleber nach 2/3-Teilhepatektomie darzustellen und wahrscheinliche Angriffspunkte dieser Medikamente im Zellzyklus zu diskutieren.

Die Bestimmung der Teilphasen des Zellzyklus sowie bisherige Untersuchungen und Hypothesen zur Zellregeneration nach Teilhepatektomie wurden kurz dargestellt.

In einer ersten Versuchsanordnung (A) wurde von der 20. bis 40. Stunde nach Teilhepatektomie mit Hilfe der ^{3}H-Thymidin-Pulsinjektion der zeitliche Regenerationsablauf für Hepatozyten und Sinuswandzellen sowie seine Beeinflussung durch Pulsinjektion der untersuchten Cytostatika beschrieben. Die Injektion von ^{3}H-Thymidin intraperitoneal (2 mCi/d, spezifische Aktivität 20,0 Ci/mMol, Nen, Boston) erfolgte jeweils 1 Stunde vor Tötung. Die tägliche Pulsinjektion der Cytostatika begann unmittelbar im Anschluß an die Teilhepatektomie (Cyclophosphamid 60 mg/kg/d; Methotrexat 1,3 mg/kg/d, Azathioprin 25 mg/kg/d). Die Tagesdosis der Medikamente war in allen Versuchen gleichbleibend und entspricht etwa derjenigen, die bei Ratten denselben cytostatischen bzw. immunosuppressiven Effekt auslöst wie in der Therapie beim Menschen (KLINGE et al. 1973).

Ausgewertet wurden aus Versuchsanordnung A die Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld, der Markierungsindex der Hepatozyten und Sinuswandzellen, der Mitoseindex der Hepatozyten, die Silberkorndichte über markierten Hepatozyten-Kernen 20 Stunden nach Teilhepatektomie, zum

gleichen Zeitpunkt auch die gemessene Radioaktivität in veraschten Gefrierschnitten (umgerechnet in µCi/g Lebertrockengewicht).

In einer zweiten Versuchsanordnung (B) wurden durch eine 3-tätige ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion alle während der radioaktiven Versuchszeit in die DNS-Synthese eintretenden Kerne von Hepatozyten, Sinuswandzellen und Gallengangsepithelien markiert. Die radioaktive Dauerinfusion begann unmittelbar im Anschluß an die Teilhepatektomie, ebenso die Applikation der Cytostatika als Dauerinfusion bzw. tägliche Pulsinjektion. Ausgewertet wurden aus Versuch B die Anzahl der Hepatozyten und Sinuswandzellen pro Blickfeld, der Markierungsindex der Hepatozyten, Sinuswandzellen und Gallengangsepithelien sowie die gemessene Radioaktivität in den Gefrierschnitten nach Veraschung (umgerechnet in µCi/g Lebertrockengewicht).

Unter Berücksichtigung der Literatur erlauben die Ergebnisse den Schluß, daß die Medikamente vorzugsweise an folgende Stellen des Zellzyklus in die Regeneration eingreifen:

1. Cyclophosphamid verzögert die S-Phase. Auch ein Angriff am Übergang von der Funktionsphase G_o in die Proliferationsphase ist ebensowenig auszuschließen wie eine Verzögerung der Mitose selbst.

2. Methotrexat verzögert am wahrscheinlichsten die Mitose, was nach den vorliegenden Ergebnissen auch die Möglichkeit einer Störung prämitotischer Zyklusphasen, z.B. des G_o-G_1-Überganges nicht ausschließt.

3. Azathioprin behindert offenbar nicht den Eintritt in die S-Phase, könnte jedoch das Ausmaß der DNS-Synthese reduzieren. Als einziges der untersuchten Medikamente ver-

mindert Azathioprin bei 3-tägiger ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion die "growth fraction" merklich, besonders in der Applikation als Dauerinfusion und ist damit in der Lage, einen Teil der Hepatozyten am Übertritt von der Funktionsphase G_o in die Proliferation zu hindern. Auch der Eintritt in die Mitose scheint durch einen G_2-Block verzögert. Die Leberregeneration wird unter Azathioprin-Wirkung maßgeblich von einer Zellhypertrophie getragen.

Der Einfluß der Cytostatika auf das Verhalten der Sinuswandzellen zeigt, daß diese Zellart einem von den Hepatozyten weitgehend unabhängigen Proliferationsmodus folgt. Eine vorwiegend lokale Proliferation in der Leber ist wahrscheinlicher als eine Genese aus Knochenmarkszellen, da die Cytostatika in der verwendeten Dosierung dann zu einer stärkeren Hemmung der Sinuswandzell-Proliferation hätten führen müssen. Lediglich Azathioprin zeigt einen stärkeren Hemmeffekt auch auf die Proliferation dieser Zellart.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

ALTMANN, H.W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50: 15-51 (1966).

BADE, E.G., SADNIK, I.L., PILGRIM, C., MAURER, W.: Autoradiographic Study of DNA-Synthesis in the Regenerating Liver of the Mouse. Exptl. Cell Res. 44: 676-678 (1966).

BASERGA, R.: Biochemical Events in the Cell Cycle. In: Human Tumor Cell Kinetics; S. PERRY, Ed., National Cancer Institute, Monograph 30 (1969), pp. 1-14.

BROWN, S.S., NEAL, G.E., WILLIAMS, D.C.: Lack of Effect of Methotrexate on Hepatic Regeneration. Nature (London) 206: 1007-1009 (1965).

BUCHER, N.L.R.: Regeneration of Mammalian Liver. Intern. Rev. Cytol. 15: 245-300 (1963).

BUCHER, N.L.R., MALT, R.: Regeneration of Liver and Kidney. Boston; Little, Brown & Co. (1971), pp. 1-176.

BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie, 2. Aufl., de Gryter, Berlin (1971), St. 93 ff.

BÜCHNER, F.: Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner morphologischer Methoden. Verh. Dtsch. Ges. Path. 1961 (45. Tagg., St. 37-59).

CAMERON, J.L.: Perspectives on Drugs and the Cell Cycle. In: Drugs and the Cell Cycle, A.M. ZIMMERMAN; G.M. PADILLA; J.M. CAMERON, Eds.; New York, London, Academic Press (1973), pp. 1-10.

CARR, J.: The Kupffer Cell - An Overview. In: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells. E. WISSE; D.L. KNOOK, Eds.; Amsterdam, Elsevier/North Holland, Biomedical Press, pp. 459-469 (1977).

COWARD, J.E.; MORSE, P.A. jr.; GENTRY, G.A.: Effect of Methotrexate on Pyrimidine-Metabolism in Regenerating Rat Liver. Biochem. et Biophys. Acta 155: 605-608 (1968).

DALEN, H.; OFTEBRO, R.; ENGESET, A.: The Effect of Methotrexate and Leucovorin on Cell Division in Chang Cells. Cancer 18: 41-48 (1965).

EPIFANOVA, O.J.; SMOLENSKAJA, I.N.; POLUNOVSKY, V.A.: Responses of Proliferating an Non-Proliferating Chinese Hamster Cells to Cytotoxic Agents. Brit. J. Cancer 37: 377-385,(1978).

FABRIKANT, J.I.: The Kinetics of Cellular Proliferation in Regenerating Liver. J. Cell Biol. 36: 551-565 (1968).

FABRIKANT, J.I.: Kinetics in the Regenerating Liver. In: Human Tumor Cell Kinetics; S. PERRY, Ed.; National Cancer Institute, Monography 30 (1969), pp. 169-183.

FREEMAN-NARROD, M. et al.: Comparison of Serum Concentrations of Methotrexate after Various Routes of Administration. Cancer 36: 1619-1624 (1975).

VAN FURTH, R. et al.: The Bone Marrow Origin of Kupffer Cells. In: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells. E. WISSE; D.L. KNOOK, Eds.; Amsterdam, Elsevier/North Holland, Biomedical Press, pp. 471-480 (1977).

GERSHBEIN, L.L.; PEDROSO, A.F.: Liver Regeneration in the Presence of Antitumor Antibiotics and Antimetabolites. Acta Hepatosplen. (Stuttgart) 15: 89-97 (1968).

GONCHAROVA, S.A.; FRANKFURT, O.S.: Effect of Methotrexate on the Cell Cylce of L 1210 Leukemia. Cell Tissue Kinet. 9 (4): 333-340 (1976).

GONZALEZ, E.M.; KREJCZY, K.; MALT, R.A.: Modification of Nucleic Acid Synthesis in Regenerating Liver by Azathioprine. Surgery 68: 254-259 (1970).

GRISHAM, J.W.: Effects of Drugs on Hepatic Cell Proliferation. In: Drugs and the Cell Cycle, A.M. ZIMMERMAN, G.M. PADILLA, J.M. CAMERON, Eds.; New York, London, Academic Press (1973), pp. 95-136.

GRUNICKE, H.; LIERSCH, M.; HOLZER, H.; ARNOLD, H.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Endoxan. Biochem. Pharmacol. 14: 1485-1490 (1965).

HEGEWALD, G.; BÄRENWALD, G.: Morphologische Veränderungen der Rattenleber durch längerdauernde Zyklophosphamidgaben. Acta Hepato-Gastroenterol. 19: 85-90 (1972).

HEINE, W.D.: Das kompensatorische Nierenwachstum und seine Regulation. Habilitationsschrift Würzburg, 1973.

HEINE, W.D.: Proliferation Kinetics of Kupffer-Cells. In: The Reticuloendothelial System and the Pathogenesis of Liver Disease; H. LIEHR, M. GRÜN, Eds.; Elsevier/North Holland Biomedical Press; pp. 27-44 (1980).

HEINE, W.D.; STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus seniler Ratten nach Teilhepatektomie. Verh. Dtsch. Ges. Path. 54: 550-554 (1970).

HIGGINS, G.M.;
ANDERSON, R.M.:
Experimental Pathology of Liver. Restoration of the Liver in the White Rat following Partial Surgical Removal.
Arch. Path. (Chicago) 12: 186-202 (1931).

HOFFMAN, J.;
POST, J.:
Effects of Nitrogen Mustard, Methotrexate and Hydrocortisone on Cell Replication in Rat Ileum and Spleen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140: 444-448 (1972).

HOFFMAN, J.;
POST, J.:
The Effects of Antitumor Drugs on the Cell Cycle. In: Drugs and the Cell Cycle, A.M. ZIMMERMAN, G.M. PADILLA, J.M. CAMERON, Eds.; New York, London, Academic Press (1973), pp. 219-247.

HRYNIUK, W.M.;
FISCHER, G.A.;
BERTINO, J.M.:
S-Phase-Cells of Rapidly Growing and Resting Populations. Differences in Response to Methotrexate.
Molec. Pharmacol. 5: 557-564 (1969).

IWATA, T.;
OTA, K.:
Effect of Anticancer Drugs on DNA-Synthesis and Mitosis in Regenerating Rat Liver.
Gann 60: 13-22 (1968).

JENSEN, M.K.;
SØBORG, M.:
Chromosome Aberrations in Human Cells Following Treatment with Imuran.
Acta Med. Scand. 179: 249-250 (1966).

KLINGE, O.;
HEINE, W.D.;
RÖSCHLAU, T.:
Influences of Cytostatic and Immunosuppressive Drugs on Liver Regeneration.
In: 3rd Workshop on Experimental Liver Injury, R. LESCH, W. REUTTER, Eds., Freiburg i.Br., W. Germany, Oct. 15th-16th, 1973, pp. 75-84.

KLINGE, O.;
MATHYL, J.:
Tageszeitliche Mitoserhythmen in der teilhepatektomierten Rattenleber.
Virchows. Arch., Abt. B (Zellpathol.) 2: 154-162 (1969).

KORT, W.J.;
VAN DER POST, J.:
Influence of Azathioprine and Prednisone on Rat Liver Regeneration.
Europ. Surg. Res. 5: 373-383 (1973).

KUSCHINSKY, G.;
LÜLLMANN, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
6. Aufl., Thieme, Stuttg. 1974, S. 231-237.

LABOW, R.;
MALEY, G.F.;
MALEY, F.:
The Effect of Methotrexate on Enzymes Induced Following Partial Hepatectomy.
Cancer Res. 29: 366-372 (1969).

LAVIN, P.;
KOSS, L.G.:
Effects of a Single Dose of Cyclophosphamide on Various Organs in the Rat.
III. Electron Microscopic Study of the Liver.
Am. J. Pathol. 62: 159-168 (1971).

Mc BURNEY, M.W.;
WHITMORE, G.F.:
Mechanism of Growth Inhibition by Methotrexate.
Cancer Res. 35 (3): 586-590 (1975).

MALAMUD, D.;
GONZALEZ, E.M.;
CHIU, H.;
MALT, R.:
Inhibition of Cell Proliferation by Azathioprine.
Cancer Res. 32: 1226-1229 (1972).

MARTIN, D.S.
et al.:
An Overview of Thymidine.
Cancer 45 (6): 1117-1128 (1980).

MATHIES, H.:
Azathioprin in der Rheumatologie.
Fortschr. d. Medizin 97 (48): 2211-2250 (1979).

MESCHAN, J.;
CASTELLS, J.:
The Utilisation of Methotrexate, Aminopterin, Spleen Homogenate, Thymus Homogenate and DNA as Test Agents for Suppression of DNA Synthesis in Regenerating Rat Liver.
Radiology 83: 520-527 (1964).

MIETKIEWSKI, K.;
KARON, H.;
WARCHOL, J.B.:
The Effect of Cyclophosphamide (Endoxan) on Histioenzymatic Reaction in the Liver II. Studies on Liver Regeneration during Cyclophosphamide Administration.
Acta Histochem. (Jena) 45: 185-198 (1973).

MORNINGTON, B.:
Nebenwirkungen von Azathioprin (IMUREK) beim Menschen.
Vortrag gehalten anläßlich des 10. Europ. Kongresses für Allergologie und Klinische Immunologie in Prag, Sept. 1977.

NEWBOLD, P.C.: Experimental Studies on Methotrexate and Rat Liver.
Br. J. Dermatol. 89: 343-349 (1973).

NGU, V.A.; ROBERTS, D.; HALL, T.C.: Studies on Folic Reductase. I. Levels in Regenerating Rat Liver and the Effect of Methotrexate Administration.
Cancer Res. 24: 989-993 (1964).

OEHLERT, W.; HÄMMERLING, W.; BÜCHNER, F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. Pathol. Anat. 126: 91-112 (1962).

PALME, G.; LISS, E.; WIEBEL, F.: Autoradiographische Untersuchungen über das Verhalten einzelner Interphasenabschnitte des Dünndarmepithels der Maus unter Einwirkung von Cyclophosphamid.
Naturwiss. 51: 197 (1964).

PAYNE, H.G.; NELSON, L.W.; WEIKEL, J.H.: Effects of Cyclosphosphamide on Somatic Cell Chromosomes in Rat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 30 (3): 360-368 (1974).

PERINGS, E.; HUNSTEIN, W.; SCHUMANN, E.: Zur Frage der Leberregeneration bei Azathioprinbehandlung. Tierexperimentelle Untersuchungen an teilhepatektomierten Ratten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77: 1306-1308 (1971).

QUASTLER, H.;
SHERMAN, F.G.:
Cell Population Kinetics in the Intestinal Epithelium of the Mouse.
Exptl. Cell Res. 17: 420-438 (1959).

RABES, H.;
WIRSCHING, R.;
TUCZEK, H.V.:
Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie.
Naturwiss. 59: 221-222 (1972).

REICHART, P.A.;
ALTHOFF, J.:
The Effects of Cyclophosphamide, Nitrosomethylurea and Benzo(a)pyrene on the Rat Incisor.
Exp. Pathol. 18: 288-296 (1980).

RYABININA, Z.A.;
BUDIK, V.M.;
LISNEVSKAYA, E.A.:
DNA Synthesis, Mitotic Activity and Hypertrophy of Rat Regenerating Liver and Uninjured Spleen Cells following Azathioprine Administration.
Biull. Eksp. Biol. Med. 78 (11): 1320-1322 (1975).

SCHULTZE, B.:
Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm.
In: Handb. d. Allgem. Pathol. II/5, S. 466-670, Berlin, Heidelberg, New York 1968.

STÖCKER, E.;
BACH, G.:
Zur Proliferation und DNS-Syntheserate des Leberparenchyms nach Teilhepatektomie. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin.
Naturwiss. 52: 264-265 (1965).

STÖCKER, E.;
HEINE, W.D.:
Zum initialen Mitosegipfel in Tubulusepithelien nach Ischaemie der kontralateralen Niere. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin.
Naturwiss. 52: 212 (1965).

STÖCKER, E.;
HEINE, W.D.:
Proliferation und Regeneration in Leber und Niere der juvenilen Ratte. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin-Dauerinfusion.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 55: 483-488 (1971).

STÖCKER, E.;
PFEIFER, U.:
Zum Proliferationsmodus des Leberparenchyms nach Teilhepatektomie.
Naturwiss. 52: 663 (1965).

STÖCKER, E.;
PFEIFER, U.:
Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin an der regenerierenden Rattenleber.
Z. Zellforsch. 79: 374-388 (1967).

STÖCKER, E.;
SCHULTZE, B.;
HEINE, W.D.;
LIEBSCHER, H.:
Wachstum und Regeneration in parenchymatösen Organen der Ratte. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin.
Z. Zellforsch. 125: 306-331 (1972).

STUART, J.F.B.;
et al.:
Biovaliability of Methotrexate: Implications for Clinical Use.
Cancer Chemother. Pharmacol. 3: 239-241 (1979).

THOMFORD, N.R.; ZACHMAN, J.O.; PATTI, R.W.: Effect of Azathioprine on Hepatic Regeneration in Rats. Am. Surg. 37: 366-368 (1971).

VOLKMAN, A.: The Unsteady State of the Kupffer Cell. In: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells, E. WISSE, D.L. KNOOK, Eds.; Amsterdam, Elsevier/North Holland. Biomedical Press, pp. 459-469 (1977).

VAN VROONHOVEN, T.J.; MALAMUD, D.; MALT, R.: Reversal of Azathioprine-Induced Inhibition of Hyperplasia in Regenerating Liver. Transplantation 14: 603-607 (1972).

VAN VROONHOVEN, T.J.; MALT, R.A.: Rebound Hyperplasia of Regenerating Liver after Cessation of Azathioprine. Surg. Forum 22: 339-340 (1971).

WEINBREN, K.; TAGHIZADEH, A.: The Mitotic Response after Subtotal Hepatectomy in the Rat. Brit. J. Exp. Pathol. 46: 413-417 (1965).

WHEELER, G.P.; ALEXANDER, J.A.: Effects of Nitrogen Mustard and Cyclophosphamide upon the Synthesis of DNA in Vivo and in Cell-Free Preparations. Cancer Res. 29: 98-109 (1969).

WISSE, E.: Ultrastructure and Function of Kupffer Cells and other Sinusoidal Cells in the Liver. In: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells, E. WISSE, D.L. KNOOK, Eds., Amsterdam, Elsevier/North Holland, Biomedical Press, pp. 33-60 (1977).

ZACHARIAE, H.;
SCHIØDT, T.:

Liver Biopsy in Methotrexate Treatment. Acta Dermatovener. (Stockholm) 51: 215-220 (1971).

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. W.-D. Heine, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und seinen stets gern gewährten Rat.

Herrn Professor Dr. med. H.-W. Altmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr. med. O. Klinge danke ich für seine maßgebliche Hilfe bei der Planung und Durchführung der Tierexperimente.

L E B E N S L A U F

Am 15. Januar 1952 wurde ich als fünftes Kind des Chirurgen Dr. med. Franz Lazarus und seiner Ehefrau Anna, geb. Heußler, in Würzburg geboren.

Nach vier Jahren Volksschule von 1958 bis 1962 besuchte ich hier das Humanistische Gymnasium (Riemenschneider-Gymnasium), wo ich im Mai 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1971/72 nahm ich das Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf, wo ich im Oktober 1972 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im April 1974 die Ärztliche Vorprüfung und im April 1978 den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand.

Im sogenannten Praktischen Jahr vom 01. April 1977 bis 31. März 1978 war ich in den Fächern Chirurgie und Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus Schweinfurt, im Wahlfach Anästhesie an der Universitätsklinik Würzburg tätig.

Seit 01. September 1978 arbeite ich als Assistenzarzt am Institut für Anaesthesiologie der Universität Würzburg.

Werner Lazarus

Würzburg, im Mai 1981 Werner Lazarus

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80